

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



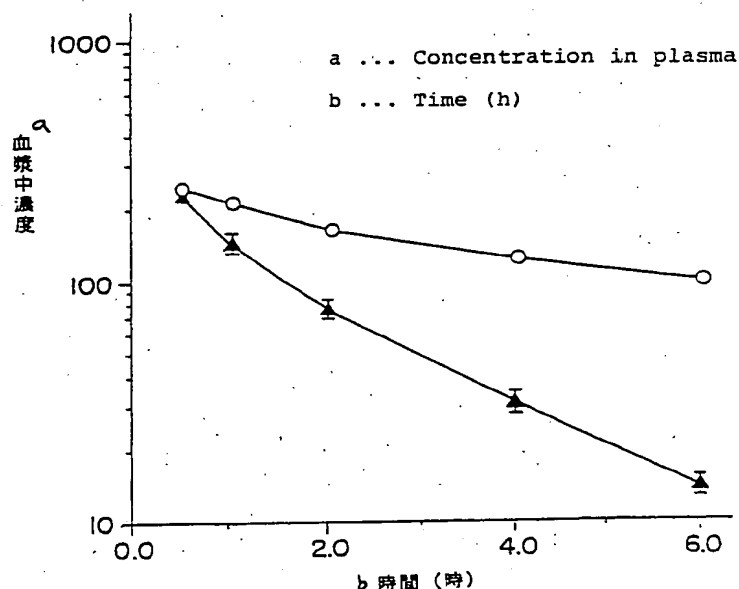
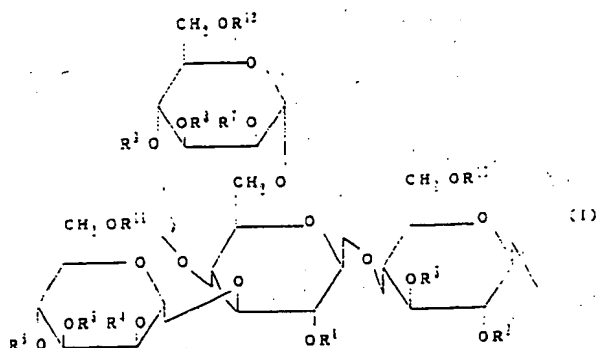
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 C08B 15/00		A1	(11) 国際公開番号 WO 92/14759
			(43) 国際公開日 1992年9月3日 (03.09.1992)
(21) 国際出願番号 PCT/JP92/00184 (22) 国際出願日 1992年2月21日 (21. 02. 92) (30) 優先権データ 特願平3/27544 1991年2月21日 (21. 02. 91) JP 特願平3/360395 1991年12月27日 (27. 12. 91) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ディ・ディ・エス研究所 (DRUG DELIVERY SYSTEM INSTITUTE, LTD.) [JP/JP] 〒102 東京都千代田区三番町26番地 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 井上和弘 (INOUE, Kazuhiro) [JP/JP] 〒274 千葉県船橋市松ヶ丘5-6-6 Chiba, (JP) 伊藤照臣 (ITO, Teruomi) [JP/JP] 〒270 千葉県松戸市新松戸6-89-104 Chiba, (JP) 川口隆行 (KAWAGUCHI, Takayuki) [JP/JP] 〒170 東京都豊島区巣鴨1-15-2-406 Tokyo, (JP) 青野勝利 (AONO, Katsutoshi) [JP/JP] 〒631 奈良県奈良市学園朝日元町2-529-3 B-308 Nara, (JP) 奥野 哲 (OKUNO, Satoshi) [JP/JP] 〒341 埼玉県三郷市早稲田8-5-18 Saitama, (JP) 矢野敏郎 (YANO, Toshiro) [JP/JP] 〒277 千葉県柏市あけぼの3-1-8-410 Chiba, (JP)		(74) 代理人 弁理士 佐藤一雄, 外 (SATO, Kazuo et al.) 〒100 東京都千代田区丸の内三丁目2番3号 富士ビル323号 協和特許法律事務所 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AT (欧州特許), BE (欧州特許), CA, CH (欧州特許), DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), GR (欧州特許), IT (欧州特許), JP, LU (欧州特許), MC (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許) US. 添付公開書類 国際調査報告1	

(54) Title: CARBOXYMETHYLMANNOGLUCAN AND DERIVATIVE THEREOF

(ng/ml)

(54) 発明の名称 カルボキシメチルマンノグルカン及びその誘導体

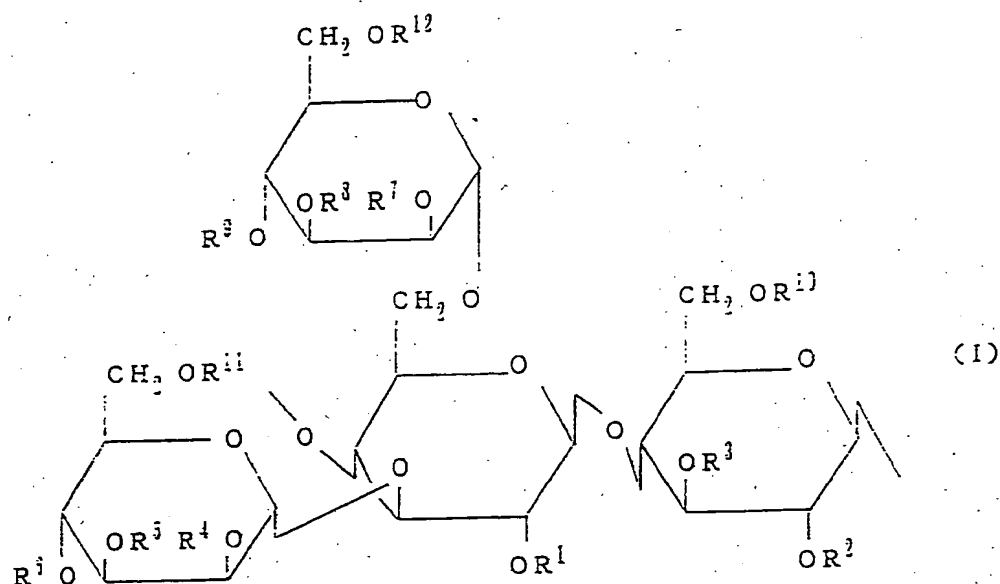


(57) Abstract

A carboxymethylmannoglucan composed of tetrasaccharide units represented by general formula (I), and a salt thereof; and another carboxymethylmannoglucan wherein part or the whole of the mannopyranose rings of the tetrasaccharide units are opened and part or the whole of those glucopyranose rings, among the glucopyranose rings of the main chain, from which no mannopyranose rings branch off are opened, and a salt thereof: wherein R_1 to R_{12} represent each hydrogen or carboxymethyl. These compounds serve as a pharmaceutical carrier useful for retarding the disappearance of a pharmaceutical in blood and enhancing its directivity toward cancer tissues.

(57) 要約

下記的一般式 (I) で表わされるテトラサッカライド単位から構成される、カルボキシメチルマンノグルカン及びその塩。また、このテトラサッカライド単位の一部または全部のマンノースを開環し、更に主鎖を構成するグルコースのうちマンノールが分枝していないグルコースの一部または全部を開環したカルボキシメチルマンノグルカン誘導体及びその塩。



(式中、 $R_1 \sim R_{12}$ は水素原子またはカルボキシメチル基を表わす。)

前記化合物は、医薬品の血中における消失を遅延させ、かつ、医薬品の癌組織への指向性を高めるために有用な担体である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストリア
AU オーストラリア
BB オバルバードス
BE ベルギー
BF ブルキナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナナン
BR ブラジル
CA カナダ
CF 中央アフリカ共和国
CG コンゴ
CH スイス
CI コート・ジボアール
CM カメルーン
CS チェコスロバキア
DE ドイツ
DK デンマーク

ES スペイン
FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GN ギニア
GB イギリス
GR ギリシャ
HU ハンガリー
IE アイルランド
IT イタリア
JP 日本
KP 朝鮮民主主義人民共和国
KR 大韓民国
LI リヒテンシュタイン
LK スリランカ
LU ルクセンブルグ
MC モナコ

MG マダガスカル
ML マリ
MN モンゴル
MR モーリタニア
MW マラウイ
NL オランダ
NO ノルウェー
PL ポーランド
RO ルーマニア
RU ロシア連邦
SD スーダン
SE スウェーデン
SN セネガル
SU ソビエト連邦
TD チャド
TG トーゴ
US 米国

- 1 -

明 細 書

カルボキシメチルマンノグルカン及びその誘導体

〔発明の背景〕

（産業上の利用分野）

本発明は新規なカルボキシメチルマンノグルカン及びその誘導体並びにその塩に関する。更に詳しくは、医薬品の血中における消失を遅延させ、かつ、該医薬品の癌組織への指向性を高めるために有用な担体としてのカルボキシメチルマンノグルカン及びその誘導体並びにその塩に関する。

（従来の技術）

水溶性高分子を薬物担体として使用することは、従来からとりわけ製剤の分野において試みられ、関連する多数の技術が提供されてきた。多くの場合においてそれらにはカルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース等のセルロース誘導体が使用され、これらの物質自体の物理化学的性状を利用して薬物の分散化、徐放化等が意図されてきた。しかしこれらの例において薬物は、担体としてのセルロース誘導体と製剤的な混合によって一体化はしているものの、担体に化学結合してはいない。

ところで、薬物を必要な組織に必要な時に必要な量だ

け送達する、いわゆる臓器指向の技術において、水溶性高分子を薬物担体として利用する場合には、単なる混合ではなく、薬物を担体に化学結合させる必要がある。そのような試みとしてはデキストランにマイトマイシンCを結合させること（瀬崎仁：薬学雑誌、109，611-621（1989））、マンナンにマイトマイシンCを結合させること（第49回日本癌学会総会記事（1990）、425頁、演題番号2155）、マンナンにブレオマイシンを結合させること（第49回日本癌学会総会記事（1990）、425頁、演題番号2154）などがなされている。しかし、新規に多糖型水溶性高分子を合成し、これに薬物を化学結合して薬物送達を行う技術についての試みは未だ十分な展開がなされていないのが実状である。

〔発明の概要〕

上記にかんがみ本発明者はマンノグルカンなる多糖高分子に着目し、これをカルボキシメチル化することを試みたところ、得られた物質は新規な多糖型水溶性高分子であり、これに薬物を化学結合させて薬物送達を行う技術、特に薬物の血中消失速度を小さくし、癌組織への薬物の移行を高める技術のための担体として有用な物質であることを見出だし、本発明を完成するに至った。

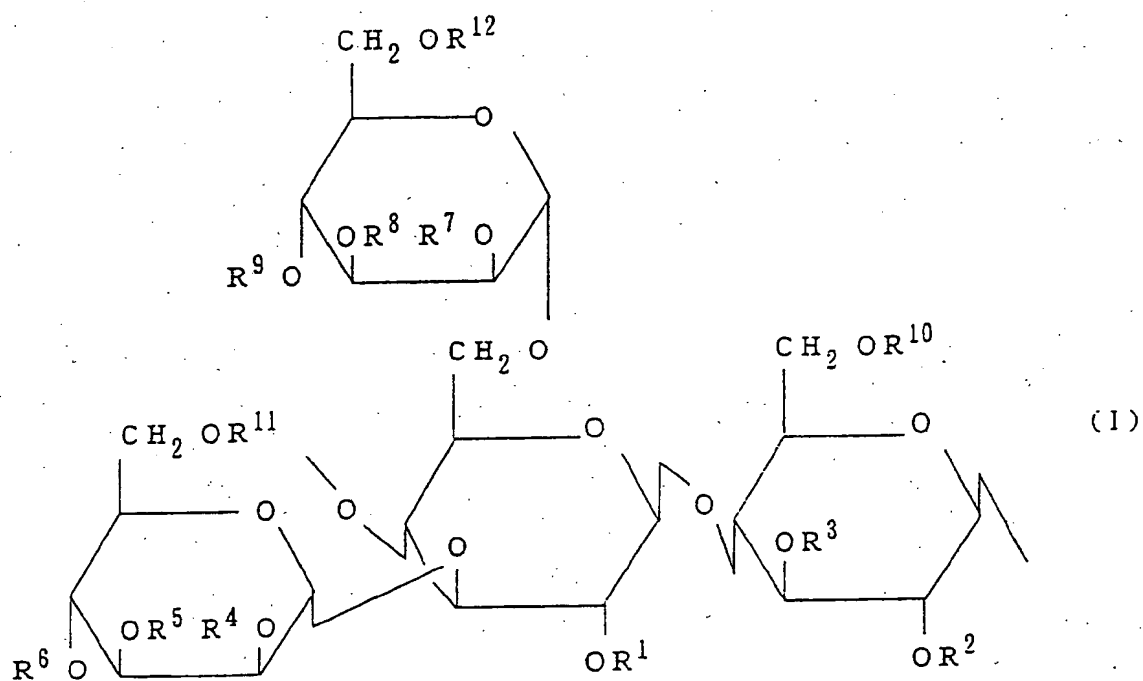
すなわち本発明は、薬物を化学結合を介して保持し、適切な薬物送達を可能とする多糖型水溶性高分子を提供

- 3 -

することを目的としている。

更に本発明は、医薬品の血中における消失を遅延させ、かつ、該医薬品の癌組織への指向性を高めるために有用な多糖型水溶性高分子を提供することを目的としている。

本発明の第一の態様によるカルボキシメチルマンノグルカン及びその塩は、下記的一般式（I）で表わされるテトラサッカライド単位から構成されるもの、である。

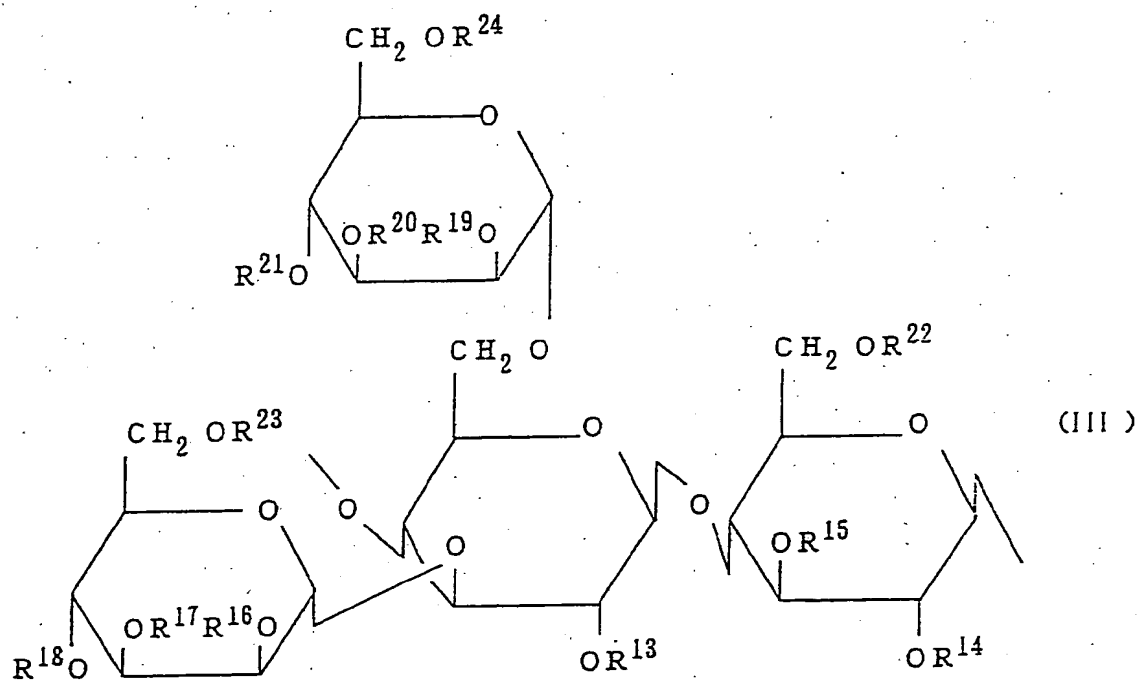


（式中、

R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹、R¹⁰、R¹¹及びR¹²は、同一又は異なっているとしてもよく、それぞれ水素原子又はCH₂COOHを表わす。）

また、本発明の第二の態様によるカルボキシメチルマ

ンノグルカン誘導体及びその塩は、下記的一般式 (III) で表わされるテトラサッカライド単位から構成されるもの、である。



(式中、

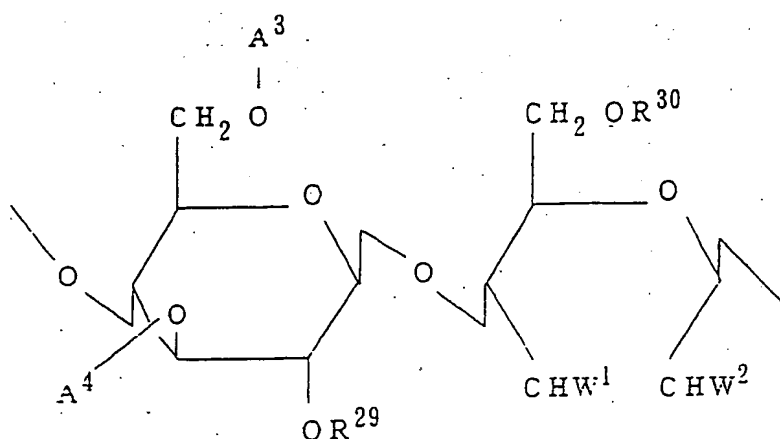
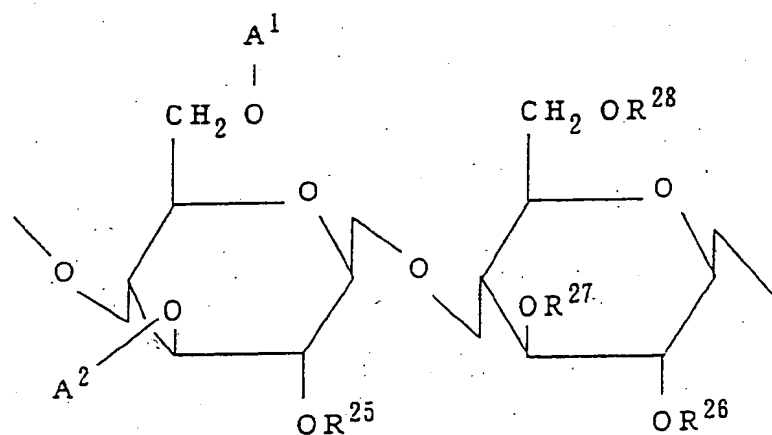
R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} 、 R^{16} 、 R^{17} 、 R^{18} 、 R^{19} 、 R^{20} 、 R^{21} 、 R^{22} 、 R^{23} 及び R^{24} は、水素原子、 CH_2COOH 、 $CH_2CONR^{*1}R^{*2}$ (ここで $NR^{*1}R^{*2}$ は、一般式 $HNR^{*1}R^{*2}$ で表わされるアミノ基を有する医薬化合物のアミノ基から水素原子を一個除いた残基を表わす)、 CH_2COOR^{*3} (ここで OR^{*3} は、一般式 HOR^{*3} で表わされるアルコール性水酸基を有する医薬化合物のアルコール性水酸基

から水素原子を除いた残基を表わす)、又は

$\text{CH}_2\text{COO} \cdot 1/2 [\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]$ (ここで Pt は二価の白金を表す) を表わす。

ただし、分子中の少なくとも1つの $\text{R}^{13} \sim \text{R}^{24}$ は $\text{CH}_2\text{CONR}^{*1}\text{R}^{*2}$ 、 $\text{CH}_2\text{COOR}^{*3}$ 又は $\text{CH}_2\text{COO} \cdot 1/2 [\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]$ を表わす。)

更に、本発明の第三の態様による酸化カルボキシメチルマンノグルカン及びその誘導体並びにその塩は、下記的一般式 (IV) で表わされる単位及び/又は下記的一般式 (V) で表わされる単位から構成されるもの、である。



[式中、

R^{25} 、 R^{26} 、 R^{27} 、 R^{28} 、 R^{29} 及び R^{30} は、同一又は異なっているとしてもよく、それぞれ水素原子又は

CH_2COOH を表わし、

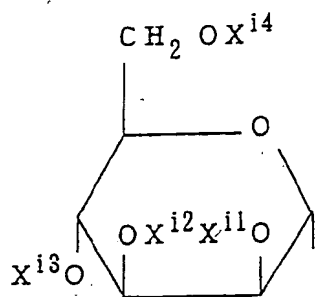
W^1 及び W^2 はそれぞれ $=O$ 又は $=N-R^{*4}$ (ここで R は一般式 H_2N-R^{*4} で表わされるアミノ基を有する医薬化合物のアミノ基から水素原子を二個除いた残基を表わす) を表わし、

A^1 及び A^2 は、同一又は異なっているとしてもよく、それぞれ下記式 (VI)、式 (VII)、式 (VIII) 又は式 (IX) を表わし、

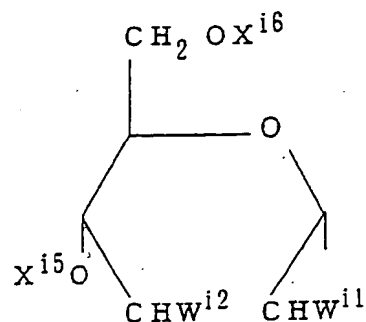
A^3 及び A^4 は、同一又は異なっているとしてもよく、それぞれ下記式 (VII)、式 (VIII) 又は式 (IX) を表わすが、

ただし、分子が前記一般式 (IV) のみからなる場合、分子中の A^1 及び A^2 の全てが式 (VI) を表わすことはない。

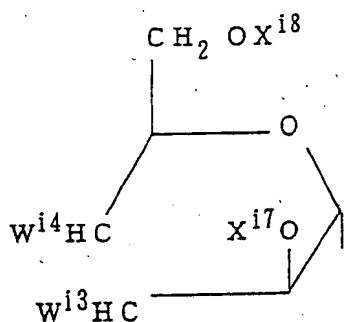
- 7 -



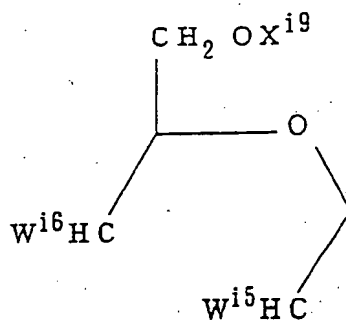
(VI)



(VII)



(VIII)



(IX)

(ここで、

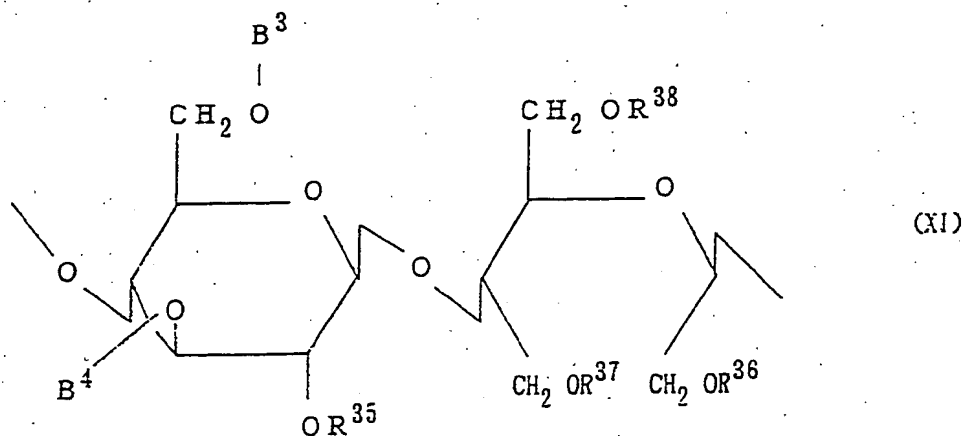
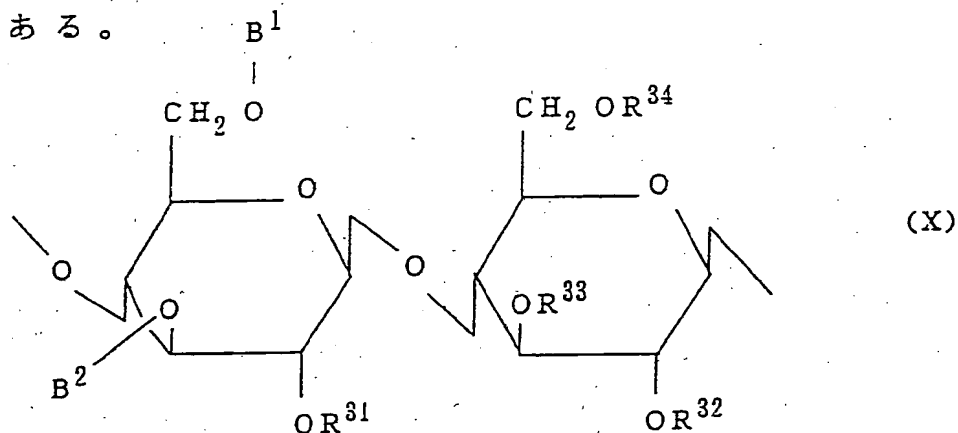
X^{i1} 、 X^{i2} 、 X^{i3} 、 X^{i4} 、 X^{i5} 、 X^{i6} 、 X^{i7} 、 X^{i8} 及び X^{i9} は、同一又は異なっているとしてもよく、それぞれ水素原子又は CH_2COOH を表わし、

W^{i1} 、 W^{i2} 、 W^{i3} 、 W^{i4} 、 W^{i5} 及び W^{i6} は同一又は異なっているとしてもよく、それぞれ $=O$ 又は $=N-R^{*4}$ (ここで $=N-R^{*4}$ は一般式 H_2N-R^{*4} で表わされるアミノ基を有する医薬化合物のアミノ基から水素原子を二個除いた残基を表わす) を表わすが、

ただし、式 (VI)、式 (VII)、式 (VIII) 及び式 (IX) のそれぞれにおいて $X^{i1} \sim X^{i9}$ 及び $W^{i1} \sim W^{i6}$ の

添字 i は 1 ~ 4 の整数を表わし、 A^1 、 A^2 、 A^3 及び A^4 のそれぞれを一般に A^i と記すものとする。)]

また更に、本発明による第四の態様によるカルボキシメチル開環マンノグルカン及びその誘導体並びにその塩は、下記的一般式 (X) で表わされる単位及び／又は下記的一般式 (XI) で表わされる単位から構成されるものである。



[式中、

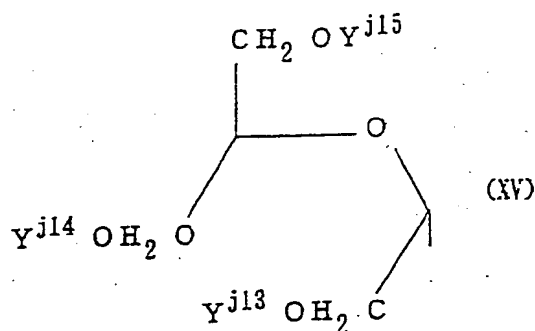
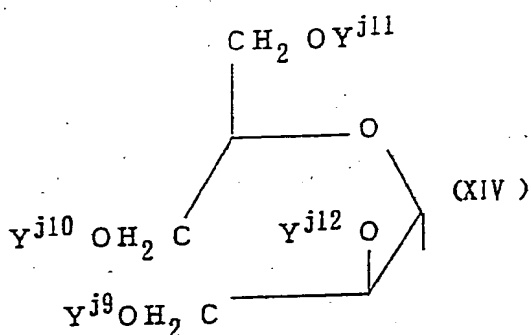
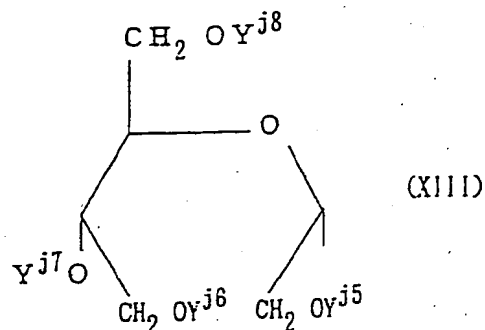
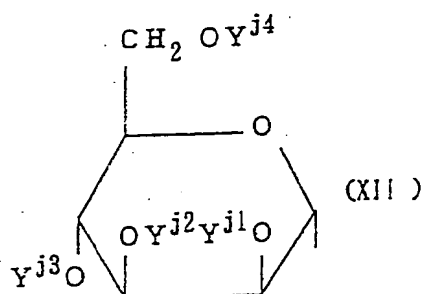
R^{31} 、 R^{32} 、 R^{33} 、 R^{34} 、 R^{35} 、 R^{36} 、 R^{37} 及び R^{38} は、同一又は異なっているいてもよく、それぞれ水素原子、

CH_2COOH 、 $\text{CH}_2\text{CONR}^{*1}\text{R}^{*2}$ 、
 $\text{CH}_2\text{COOR}^{*3}$ （ここで $\text{NR}^{*1}\text{R}^{*2}$ 及び
 OR^{*3} は請求項 5 で定義したのと同義である）又は
 $\text{CH}_2\text{COO} \cdot 1/2 [\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]$ （ここで
 Pt は二価の白金を表す）を表わし、

B^1 及び B^2 は同一又は異なっているとしてもよく、それぞ
 れ下記式 (XII)、式 (XIII)、式 (XIV) 又は式 (XV)
 を表わし、

B^3 及び B^4 は同一又は異なっているとしてもよく、それぞ
 れ下記式 (XIII)、式 (XIV) 又は式 (XV) を表わすが、

ただし、分子が前記一般式 (X) のみからなる場合、
 分子中の B^1 及び B^2 の全てが式 (XII) を表わすこと
 はない。



(ここで、

Y_{j1} 、 Y_{j2} 、 Y_{j3} 、 Y_{j4} 、 Y_{j5} 、 Y_{j6} 、 Y_{j7} 、 Y_{j8} 、 Y_{j9} 、 Y_{j10} 、 Y_{j11} 、 Y_{j12} 、 Y_{j13} 、 Y_{j14} 及び Y_{j15} は、同一又は異なってもよく、それぞれ水素原子、 CH_2COOH 、 $CH_2CONR^{*1}R^{*2}$ 又は CH_2COOR^{*3} (ここで $NR^{*1}R^{*2}$ 及び OR^{*3} は請求項 5 で定義したのと同義である) または $CH_2COO \cdot 1/2 [Pt(NH_3)_2]$ (ここで Pt は二価の白金を表す) を表わし、

ただし、式 (XII)、式 (XIII)、式 (XIV) 及び式 (XV) のそれぞれにおいて $Y_{j1} \sim Y_{j15}$ の添字 j は 1 ~

4 の整数を表わし、 B^1 、 B^2 、 B^3 及び B^4 のそれぞれを一般に B^j と記すものとする。)]

〔図面の簡単な説明〕

第 1 図は、Walker256 担癌ラットについて $18.0 \mu\text{g/Kg}$ 投与の場合の血漿中濃度の経時変化を示すグラフである。

第 2 図は、Walker256 担癌ラットについて 10 mg/Kg 投与の場合の血漿中濃度の経時変化を示すグラフである。

第 3 図は、実験例 2 で得たシッフ塩基型結合によるカルボキシメチルマンノグルカン-ダウノルビシン複合体の紫外・可視部吸収スペクトルを示す。

第 4 図は、実験例 3 で得たアミド結合を介したカルボキシメチルマンノグルカン-ダウノルビシン複合体の紫外・可視部吸収スペクトルを示す。

第 5 図は、実施例 15 で得たアミド基を介したカルボキシメチルマンノグルカン-マイトマイシン C 複合体の紫外・可視部吸収スペクトルを示す。

第 6 図は、実施例 18 で得たアミド基を介したカルボキシメチル開環マンノグルカン-マイトマイシン C 複合体の紫外・可視部吸収スペクトルを示す。

第 7 図は、実施例 18 で得たアミド基を介したカルボキシメチル開環マンノグルカン-マイトマイシン C 複合体のゲル濾過クロマトグラムを示す。

第 8 図は、実施例 23 で得たシッフ塩基型結合を介し

た酸化カルボキシメチルマンノグルカン-ダウノルビシン複合体の紫外・可視部吸収スペクトルを示す。

第9図は、実施例24で得たシッフ塩基型結合を介した酸化カルボキシメチルマンノグルカン-ダウノルビシン複合体の紫外・可視部吸収スペクトルを示す。

第10図は、実施例25で得たシッフ塩基型結合を介した酸化カルボキシメチルマンノグルカン-ダウノルビシン複合体の紫外・可視部吸収スペクトルを示す。

第11図は、実施例26で得た配位結合を介したシス-ジアニン白金(II)錯体複合体のゲル濾過溶出パターンを示す。

〔発明の具体的説明〕

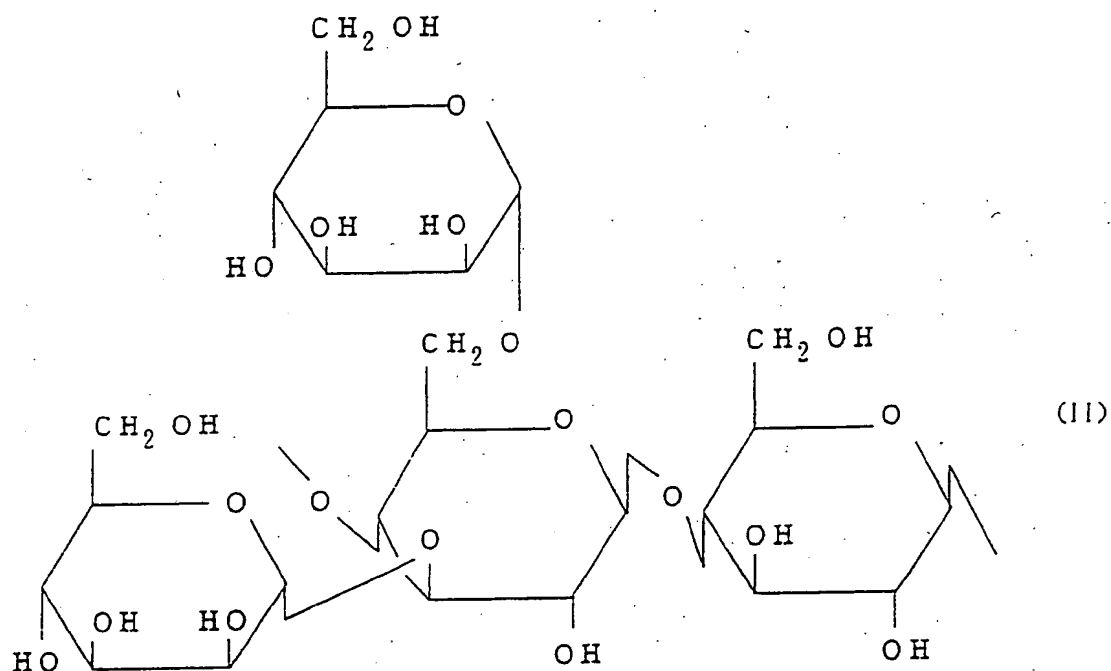
化合物

本発明の第一の態様によるカルボキシメチルマンノグルカンは、前記一般式(I)で表わされるテトラサッカライド単位から構成されるものである。ここで「テトラサッカライド単位から構成される」とは、本発明によるカルボキシメチルマンノグルカンが当該単位を繰り返す単位とした構造の高分子化合物であることを意味する。

ここで、一般式(I)で表わされるテトラサッカライド単位は、下記式(II)で表わされる基本骨格を有する。従って、本発明によるカルボキシメチルマンノグルカンは下記式(II)で表わされるテトラサッカライド単位から構成されるポリサッカライドを基本骨格とするものと

- 13 -

言い換えることができる。



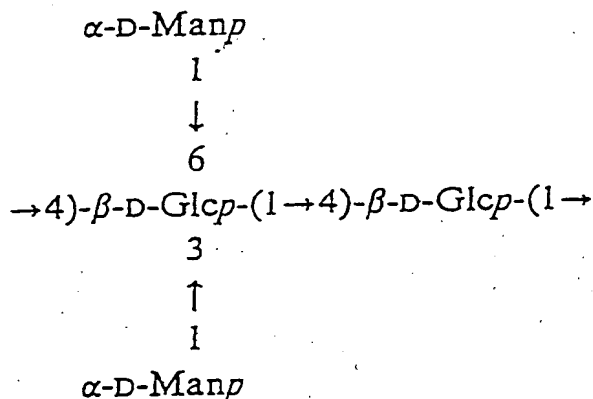
この多糖高分子については本発明者の一人らによってすでに報告されている (Inoue K. et al., Carbohydrate Res. 114, 245-256, (1983))。

この基本骨格たるポリサッカライドはD-マンノ-D-グルカンであり、このポリサッカライドの主鎖は β (1 \rightarrow 4) 結合のセルロースであって、該主鎖を構成するD-グルコース残基の1つおきにその3位及び6位に α -D-マンノシル基がそれぞれ α (1 \rightarrow 3) 結合及び α (1 \rightarrow 6) 結合によって二重分枝した構造を有している。

その構造は前記式 (II) の他に下記式のように表すこ

- 14 -

とができる。



本発明によるカルボキシメチルマンノグルカン、前記一般式 (I) で表わされるテトラサッカライド単位から構成されるものである限り、その分子量についての限定はされないものであるが、好ましくは $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^6$ 、より好ましくは 1×10^6 程度である。

本発明によるカルボキシメチルマンノグルカンは、前記基本骨格中の水酸基の水素原子がカルボキシメチル基で置換された構造を有するものと言い換えることができるが、この置換基の導入の割合は、糖残基一つあたりの置換基の数として定義される置換度によって表わすことができる。すなわち、

$$\text{置換度} = \frac{\text{分子中の置換基の総数}}{(\text{分子中のテトラサッカライド単位の総数} \times 4)}$$

と表わせる。

置換度の上限は全ての水酸基が置換された場合の3で

あるが、本発明において置換度は0.01以上が好ましい。なお、本発明においては分子中に少なくとも1つのカルボキシメチル基が存在していることが必要であり、この意味で置換度が0である化合物は除かれる。各テトラサッカライド単位の構造が前記一般式(I)の範囲内であれば、隣り合うテトラサッカライド単位においてその置換基の導入位置が同一でも異なってもよいことはいうまでもない。

本発明によるカルボキシメチルマンノグルカンハ、その塩として存在することができる。好適な塩の例としてはナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩のようなアルカリ金属またはアルカリ土類金属塩、アルギニン塩、リジン塩のようなアミノ酸塩を挙げることができる。

また本発明の第二の態様によるカルボキシメチルマンノグルカン誘導体は、前記一般式(I)のカルボキシメチルマンノグルカンから誘導される。すなわち、一般式(III)で表わされる単位から構成されるマンノグルカン誘導体は、一般式(I)において、カルボキシメチル基の一部または全部に酸アミド結合、エステル結合または配位結合を介して医薬化合物を担持した構造を有する。

導入可能な医薬化合物としては、次のようなものが挙げられる。まず、酸アミド結合を介して導入可能なものとして、一般式 $\text{HNR}^{*1}\text{R}^{*2}$ で表わされるアミノ基を有する医薬化合物が挙げられ、その具体例としては、

ダウノルビシン、ドキソルビシン、マイトマイシン C、ブレオマイシンなどが挙げられる。また、エステル結合を介して導入可能なものとして、一般式 $\text{HOR}^*{}^3$ で表わされるアルコール性水酸基を有する医薬化合物が挙げられ、その具体例としてはシクロシチジン、ピンクリスチン、ピンブラスチン、アドレナリンなどが挙げられる。更に、配位結合を介して導入可能なものとして、シスプラチンなどの白金錯体などが挙げられる。

本発明の第二の態様によるカルボキシメチルマンノグルカン誘導体はその分子量についての限定はないが、好ましくは $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^6$ 、より好ましくは 1×10^5 程度である。カルボキシメチル基の導入の割合、すなわち、置換度の上限はどのような場合にも 3 未満であり、下限は 0 を越える。好ましい置換度は 1 ~ 2 程度である。

本発明の第二の態様によるカルボキシメチルマンノグルカン誘導体も、カルボキシメチル基の塩として存在することができる。好適な塩の例としてはナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩のようなアルカリ金属またはアルカリ土類金属塩、アルギニン塩、リジン塩のようなアミノ酸塩を挙げることができる。

更に、本発明の第三の態様による酸化カルボキシメチルマンノグルカン及びその誘導体は、前記一般式 (IV) で表される単位および／または前記一般式 (V) で表さ

れる単位から構成される。なお、本明細書において「誘導体」とは、なんらかの医薬化合物が化学結合によって導入されたものを呼ぶ場合にのみ用いるものとする。従って、この第三の態様による酸化カルボキシメチルマンノグルカンとは、一般式 (I) で表されるカルボキシメチルマンノグルカンを構成するテトラサッカライド単位の一部または全部のマンノースを開裂し、更に主鎖を構成するグルコースのうちマンノースが分枝していないグルコースの一部または全部を開裂することによって得られた、アルデヒド基を開裂末端に有する構造のものであると言える。また、この第三の態様による酸化カルボキシメチルマンノグルカン誘導体は、さらにこの末端アルデヒドにシッフ塩基型結合を介して医薬化合物を導入したものであると言える。

一般式 (IV) において、 A^1 および A^2 は前記式 (VI)、式 (VII)、式 (VIII) または式 (IX) を表す。ここで、分子が前記一般式 (IV) のみからなりかつ A^1 および A^2 が全て式 (VI) である場合は除かれる。式 (VII)、式 (VIII) または式 (IX) で表される単位は、それぞれ式 (VI) で表されるマンノース残基の2位と3位の間の結合が開裂したもの、3位と4位の間の結合が開裂したもの、また2位と3位の間の結合および3位と4位の間の結合が開裂したものであるといえる。

また、一般式 (V) において、 A^3 および A^4 は前記

式 (VI)、式 (VII)、式 (VIII) または式 (IX) を表す。

また、式 (VI)、式 (VII)、式 (VIII) 及び式 (IX) のそれぞれにおいて $X^{i1} \sim X^{i9}$ 及び $W^{i1} \sim W^{i6}$ の添字 i は 1 ~ 4 の整数を表わし、 A^1 、 A^2 、 A^3 及び A^4 のそれぞれを一般に A^i と記すものとする。このことは、例えば、同一の D-グルコースから分枝している A^1 及び A^2 のそれぞれに式 (VII) で表される単位が結合している場合、 X^{i5} 、すなわち X^{15} と X^{25} とは独立しており、それぞれが異なっている場合も本発明の範囲に包含されることを意味する。また、分子中で相隣り合う一般式 (IV) および / または一般式 (V) で表される単位において、 $R^{25} \sim R^{30}$ 及び $A^1 \sim A^4$ 並びに $X^{i1} \sim X^{i9}$ 及び $W^{i1} \sim W^{i6}$ が異なってもよい。

分子中における一般式 (IV) と一般式 (V) の存在比、さらには式 (VI)、式 (VII)、式 (VIII) 及び式 (IX) の存在比は特に限定されないが、導入したい薬物の種類や親水性の程度を考慮して決定されてよい。

シッフ塩基型結合を介して導入可能な医薬化合物として、一般式 H_2N-R^{*4} で表されるアミノ基を有する医薬化合物が挙げられ、その具体例としては、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ブレオマイシンなどが挙げられる。

更に、本発明の第四の態様によるカルボキシメチル開環マンノグルカン及びその誘導体は、前記一般式 (X)

で表される単位および／または前記一般式 (X I) で表される単位から構成される。この第四の態様によるカルボキシメチル開環マンノグルカンは、まずマンノグルカンを構成するテトラサッカライド単位の一部又は全部のマンノースを開環し、更に主鎖を構成するグルコースのうちマンノースが分枝していないグルコースの一部または全部を開環して、その開環末端に形成されたヒドロキシメチル基の水素原子の一部または全部をカルボキシメチル基と置換した構造を有するものである。また、この第四の態様によるカルボキシメチル開環マンノグルカン誘導体は、このカルボキシメチル基に、酸アミド結合、エステル結合または配位結合を介して医薬化合物を担持した構造を有するものである。

一般式 (X) において、 B^1 および B^2 は前記式 (XII)、式 (XIII)、式 (XIV) または式 (XV) を表す。ここで、分子が前記一般式 (X) のみからなり、かつ B^1 および B^2 が全て式 (XII) である場合は除かれる。式 (XIII)、式 (XIV) または式 (XV) で表される単位は、それぞれ式 (XII) で表されるマンノース残基の2位と3位の間の結合が開裂したもの、3位と4位の間の結合が開裂したもの、また2位と3位の間の結合および3位と4位の間の結合が開裂したものであるといえる。また、一般式 (X) において、 B^3 および B^4 は前記式 (XIII)、式 (XIV) または式 (XV) を表す。ここで、

B^3 および B^4 が式 (XII) を表す場合は除かれる。これはマンノグルカンを酸化により開環しようとする、分枝糖のマンノースが、主鎖を構成する D-グルコースのうちマンノースが分枝していない D-グルコースに優先して酸化開裂を受けることに起因する。

また、式 (XII)、式 (XIII)、式 (XIV) 及び式 (XV) のそれぞれにおいて $Y^{j1} \sim Y^{j15}$ の添字 j は 1 ~ 4 の整数を表わし、 B^1 、 B^2 、 B^3 及び B^4 のそれぞれを一般に B^j と記すものとする。このことは、例えば、同一の D-グルコースから分枝している B^1 及び B^2 のそれぞれに式 (XIII) で表される単位が結合している場合、 Y^{j5} 、すなわち Y^{15} と Y^{25} とは独立しており、それぞれが異なっている場合も本発明の範囲に包含されることを意味する。また、分子中で相隣り合う一般式 (X) および / または一般式 (XI) で表される単位において、 $R^{31} \sim R^{38}$ 及び $B^1 \sim B^4$ 並びに $Y^{j1} \sim Y^{j15}$ が異なっているてもよい。

分子中における一般式 (X) と一般式 (XI) の存在比、さらには式 (XII)、式 (XIII)、式 (XIV) 及び式 (XV) の存在比は特に限定されないが、導入したい薬物の種類や親水性の程度を考慮して決定されてよい。

この第四の態様によるカルボキシメチル開環マンノグルカンは、医薬化合物を導入できるカルボキシメチル基を保持しつつ、かつ本発明による第一の態様のカルボキ

シメチルマンノグルカンに比較して水溶性が高い点で好ましい。

この第四の態様のカルボキシメチル開環マンノグルカンのカルボキシメチル基の一部または全部に酸アミド結合、エステル結合または配位結合を介して導入可能な医薬化合物としては、前記した第二の態様のマンノグルカン誘導体に導入可能な医薬化合物が挙げられる。

第三の態様である酸化カルボキシメチルマンノグルカン及びその誘導体並びに第四の態様であるカルボキシメチル開環マンノグルカン及びその誘導体は、それぞれ前記定義の単位から構成される限り分子量についての限定はないが、好ましくは $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^6$ である。

カルボキシメチル基の導入の割合、すなわち置換度の上限はどのような場合にも3未満であり、下限は0を越える。酸化カルボキシメチルマンノグルカン及びその誘導体の場合、好ましい置換度は0.4～1である。

酸化カルボキシメチルマンノグルカン及びその誘導体並びにカルボキシメチル開環マンノグルカン及びその誘導体も共にそれらのカルボキシメチル基の塩として存在することができる。好適な塩の例としては第一の態様および第二の態様のカルボキシメチルマンノグルカンに関して例示したものが挙げられる。

化合物の製造およびその用途

本発明の第一の態様によるカルボキシメチルマンノグ

- 22 -

ルカン は、前記式 (11) で表わされる テトラサッカライド単位から構成される マンノグルカンの水酸基の水素原子をカルボキシメチル基で置換することにより得ることができる。具体的には、式 (11) で表わされる テトラサッカライド単位から構成される マンノグルカンに、アルカリの存在下でハロゲン化酢酸またはその塩を反応させることによって得ることができる。例えば原料を水に溶解し、水酸化ナトリウムを加え、これに冷却しながらモノクロル酢酸を加え、室温で約 20 時間攪拌し、酢酸で pH を約 8 ~ 9 に調整してから、メタノール中に注加して、沈殿を集め、メタノールおよびアセトンで洗浄し、乾燥すればよい。ここでアルカリおよびモノクロル酢酸またはその塩の添加量を変えることによりカルボキシメチル基の置換度を調節することができる。

前記した式 (11) で表わされる テトラサッカライド単位から構成される マンノグルカンは、ミクロエロスポリア (Microellobosporia) 属に属する菌、例えば *Actinomyces Microellobosporia grisea* の培養液からの分離精製物から調製入手することができる (特公平 1-52402 号公報参照)。

本発明の第一の態様によるカルボキシメチルマンノグルカンは、血中からの消失速度が小さく、癌組織指向性を有している (詳細は後記実験例参照)。一方、本発明によるカルボキシメチルマンノグルカンには多数の水酸

基およびカルボキシシル基が存在することから、薬物をこれらの官能基を利用して結合させることができる。従って、本発明の第一の態様によるカルボキシメチルマンノグルカンは、薬物を化学結合を介して担持させて薬物送達を行う技術、特に薬物の血中消失速度を小さくし、癌組織への薬物の移行を高める技術において有用な担体となる。

本発明によるカルボキシメチルマンノグルカンへの薬物の導入は、薬物の性質に応じた適当な方法を選択することにより実施することができる。例えば、アミノ基を有した薬物（例えばダウノルビシン、ドキソルビシンなど）の場合、あらかじめ本発明によるカルボキシメチルマンノグルカンを過ヨウ素酸などで酸化して、マンノース部分を開裂しアルデヒド基を形成して、これに薬物をシッフ塩基として結合させることができる。また、同じくアミノ基を有した薬物の場合、カルボキシシル基とアミド結合させること、さらには、水酸基をブロムシアンで活性化した後にアミノ基を有した薬物を主としてイソウレア結合させることも可能である。なお、以上においてアミノ基を有する薬物としては、それ自体にアミノ基を有するもの、さらには結合の目的で新たにアミノ基を付したものであってもよい。更に、アミノ基を有する適当なスペーサーを選択してこれを付加することによりアミノ基を有する薬物に相当するものとしてもよい。

本発明の第一の態様によるカルボキシメチルマンノグルカンに医薬化合物を導入した具体的な例は、本発明の第二の態様によるカルボキシメチルマンノグルカン誘導体である。酸アミド結合またはエステル結合を介して医薬化合物が導入された誘導体は、一般式 (I) で表される単位から構成されるカルボキシメチルマンノグルカンまたはその塩と、前記一般式 $\text{HNR}^{*1}\text{R}^{*2}$ または一般式 HOR^{*3} で表される医薬化合物とを酸アミド結合またはエステル結合形成条件下で反応させて得ることができる。例えば、ダウノルビシンが導入された誘導体は、カルボキシメチルマンノグルカンとダウノルビシン塩酸塩とを、例えばホウ酸緩衝液 (pH 8) 中で、縮合剤としての 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EDC) の存在下に反応させ、エタノールを用いて沈殿させて得ることができる。また、配位結合を介して医薬化合物が導入された誘導体は、例えば白金錯体であるシス-ジニトラートジアンミン白金 (II) とカルボキシメチルマンノグルカンとを水溶液中で反応させて、透析後、エタノールで沈殿させて得ることができる。

本発明の第三の態様による酸化カルボキシメチルマンノグルカンは、一般式 (I) で表される単位から構成されるカルボキシメチルマンノグルカンに酸化して開環することによって得ることができる。まず、このカルボキシメチルマンノグルカンに酸化剤 (例えば過ヨウ素酸ま

たはそれらの塩)を氷冷下に加え、室温または室温以下の温度で穏やかに反応させる。酸化カルボキシメチルマンノグルカンは、例えば反応液を水に対して透析し、析出助剤としての酢酸ナトリウムを加えて、エタノール中に滴下して析出沈殿として得ることができる。ここで、加える過ヨウ素酸またはその塩の量を変化させることによって分枝マンノース残基と主鎖グルコース残基とを種々の程度にアルデヒド化することが可能であり、それによって所望の量の医薬化合物が結合し得る担体とすることができる。その他、反応時間、反応温度によってもアルデヒド化の程度を制御することが可能である。なお、アルデヒド化については Inoue K. et al., Carbohydrate Res. 123, 305-314 (1983) の記載を参照することができる。

このようにして得た酸化カルボキシメチルマンノグルカんに、一般式 H_2NR^{*4} で表される医薬化合物を Schiff 塩基型結合形成条件下で反応させて、医薬化合物が担持された誘導体を得ることができる。例えば、医薬化合物としてダウノルビシンが導入された誘導体は、ダウノルビシン塩酸塩とホウ酸緩衝液 (pH 8) - エタノール混合溶液中で反応させることによって得ることができる。

本発明の第四の態様によるカルボキシメチル開環マンノグルカンは、マンノグルカンを酸化して開環し、開環によって形成されたアルデヒド基を還元してヒドロキシ

メチル基とし、更にこのヒドロキシメチル基の一部または全部にカルボキシメチル基を導入することによって得ることができる。例えば、マンノグルカンの水溶液に酸化剤（例えば過ヨウ素酸ナトリウム）を加え、遮光下に室温または室温以下の温度で、穏やかに反応させ、反応後に水に対して透析する。次に透析内液に水素化ホウ素ナトリウムを加えて反応させ、反応液のpHを5、続いて7に調整し、水に対して透析した後、濃縮することによって開環されたマンノグルカンのポリアルコール体を得ることができる。このポリアルコール体を水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、モノクロル酢酸を加え室温で反応させた後、反応液のpHを8に調整し、エタノール中に注加すれば、カルボキシメチル開環マンノグルカンを得ることができる。

さらにこのようにして得たカルボキシメチル開環マンノグルカンに、上記第二の態様のカルボキシメチルマンノグルカン誘導体の場合と同様にして、医薬化合物を導入することができる。

〔実施例〕

参考例

以下の実施例での原料として使用したマンノグルカンはミクロエロボスポリア・グリゼア（大阪醗酵研究所寄託番号：IFO12518）を生産菌として以下のよう

に製造した。

- 27 -

G C 培 地 (グ ル コ ー ス 2 % 、 ペ プ ト ン 0 . 5 % 、 コ ー
ン ス テ ィ ー プ リ カ ー 0 . 5 % 、 酵 母 抽 出 液 0 . 3 % 、 塩
化 ナ ト リ ウ ム 0 . 5 % 、 炭 酸 カ ル シ ウ ム 0 . 3 % 、 寒 天
1 . 5 % ; pH 7 . 0) 1 0 0 ml を 含 む 坂 口 フ ラ ス コ に 本
菌 株 を ス ラ ン ト に よ り 接 種 し 、 2 8 ° C で 5 日 間 振 盪 培 養
し 、 そ の 2 ml を G C 培 地 1 0 0 ml を 含 む 坂 口 フ ラ ス コ に
接 種 し 、 同 様 に 3 日 間 培 養 し た 。 こ の 培 養 液 2 0 0 ml を
2 0 L の 生 産 培 地 (グ ル コ ー ス 3 % 、 コ ー ン ス テ ィ ー プ
リ カ ー 2 % ; pH 7 . 2) を 含 む 3 0 L ジ ャ ー フ ェ ー メ ン
タ ー に 接 種 し 、 2 8 ° C で 9 2 時 間 通 気 攪 拌 (1 0 L / min ,
2 5 0 rpm) し な が ら 培 養 し た 。 な お 、 培 養 中 の 消 泡 剤
と し て ア デ カ ノ ー ル LG805 (旭 電 化) を 使 用 し た 。 次 に
得 ら れ た 培 地 を 8 0 ° C で 2 0 分 加 熱 し た 後 に 室 温 に 冷 却
し 、 濾 過 し た 。 こ の 濾 液 を ダ イ ア イ オ ン PA306 (Cl⁻ 型)
の カ ラ ム に 通 し 、 そ の 通 過 液 に 0 . 5 L の 1 0 % セ チ ル
ピ リ ジ ニ ウ ム と 1 . 0 L の 0 . 5 M ホ ウ 酸 緩 衝 液 (pH
1 0) を 加 え た 。 生 じ た 沈 殿 を 集 め 、 水 洗 し た 後 に 2 %
酢 酸 (2 . 0 L) に 溶 解 し 、 エ タ ノ ー ル (6 . 0 L) を
加 え 、 生 ず る 沈 殿 を 集 め た 。 こ の 沈 殿 を エ タ ノ ー ル で 洗
っ た 後 に 、 0 . 0 2 % 酢 酸 ナ ト リ ウ ム 水 溶 液 (3 . 0 L)
に 溶 解 し 、 そ の 遠 心 上 澄 液 か ら エ タ ノ ー ル で 再 び 沈 殿 せ
し め 、 集 め た 沈 殿 を 7 5 % エ タ ノ ー ル 、 エ タ ノ ー ル 、 ア
セ ト ン の 順 で 洗 浄 し 、 五 酸 化 リ ン 上 5 0 ° C で 8 時 間 真 空
乾 燥 し 、 目 的 の マ ン ノ グ ル カ ン 3 6 g を 得 た 。 得 ら れ た

マンノグルカンの分子量（ゲル濾過法／標準物質：デキストラン、カラム：G5000PW）は約 1×10^6 であった。

実施例 1

前記調製例 1 で得たマンノグルカン（500 mg）に水（20 ml）と水酸化ナトリウム（1.05 g）を冷却下に加えて透明な溶液を得た。この溶液にモノクロル酢酸（1.5 g）を冷却下に加え、溶解した後に室温で 20 時間攪拌し反応させた。これに酢酸を加えて反応液の pH を 8 に調整した後に、メタノール（80 ml）中に注ぎ、生成した白色沈殿を濾取した。この沈殿をメタノールとアセトンで順次洗った後に、真空乾燥してカルボキシメチルマンノグルカン 481 mg を得た。この物質を CM-1 と命名するとともに次に示す方法により糖残基あたりの置換度（DS）を測定したところ、DS は 0.08 であった。

置換度の測定

置換度（DS）は遊離酸型について次のような逆滴定を行うことによって求めた。すなわち、まず上記のようにして得たカルボキシメチルマンノグルカン（70%硝酸／メタノール（1：10 V/V）と 3 時間室温で振盪し、メチルレッドを指示薬として 80%メタノールおよびメタノールで洗浄し、乾燥して試料とする。次にこの試料を所定過剰量の 0.1 N 水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、フェノールフタレンを指示薬として 0.1

N 塩酸で逆滴定した。試料の採取量が S (mg)、0.1 N 水酸化ナトリウムの所定過剰量が A (ml)、0.1 N 塩酸の逆滴定量が B (ml) とすると、DS は次式 (I) によって求めた。

$$DS = 16.2 (A - B) / [S - 5.8 (A - B)]$$

実施例 2 ~ 4

実施例 1 における水酸化ナトリウムおよびモノクロル酢酸のそれぞれの使用量を表 1 に記載の通りに換えて使用した以外は実施例 1 の記載と同様に実施した。

実施例 1 ~ 4 において得られた物質の収量、置換度および命名を表 1 に示す。

表 1

実施例	NaOH (g)	MCA (g)	収量(mg)	置換度(DS)	命名
1	1.05	1.5	481	0.08	CM-1
2	1.75	2.5	503	0.17	CM-2
3	2.45	3.5	524	0.31	CM-3
4	3.50	5.0	598	0.53	CM-4

MCA : モノクロル酢酸

実施例 5

実施例 1 と同様の方法により調製した CM-4 (置換度: 0.55) の 500 mg に水 20 ml と水酸化ナトリウム 3.5 g を加え、透明な溶液を得た。この溶液にモノクロロ酢酸 5.0 g を冷却下に加えて溶解した後に、室温で 20 時間反応させた。酢酸で反応液の pH を 8 に調整した後に、100 ml のメタノール中に注加して生成した沈殿を集め、メタノールで洗い、真空乾燥して CM-5 (531 mg) を得た。CM-5 の置換度は 0.81 であった。

実施例 6

実施例 5 で得た CM-5 (250 mg) に水 10 ml と水酸化ナトリウム 1.75 g を加え透明な溶液を得た。この溶液にモノクロロ酢酸 2.5 g を冷却下に加えて溶解した後に、室温で 21 時間反応させた。酢酸で反応液の pH を 8 に調整した後に、60 ml のメタノール中に注加して生成した沈殿を集め、メタノールで洗い、真空乾燥して CM-6 (261 mg) を得た。CM-6 の置換度は 1.0 であった。

実験例 1

(1) 試料と検体

実施例 1 および 4 で得られた CM-1 および CM-4 を試料とした。各試料から動物実験用の検体を用意するにあたって以下の前調製を行った。すなわち、まず各試

料を水に溶解し、0.5 M 過ヨウ素酸ナトリウムを過ヨウ素酸イオンが試料の糖残基 1 モルあたり 0.1 モル相当となる量だけ加え、室温で 25 時間反応を行った後、4℃で水に対し透析した。次にその内液に酢酸ナトリウムを加え、4 倍容のエタノール中に注ぎ、生成した沈殿をエタノールおよびアセトンで洗浄し、乾燥した。最後に得られた粉末をトリチウムラベルした水素化ホウ素ナトリウムと共に 2.5 mM 炭酸ナトリウム水溶液中にて室温で 20 時間反応させ、冷却下に酢酸で pH 5 に調整し、水に対して透析し、その内液を凍結乾燥してそれぞれ検体 1 および検体 2 とした。

(2) 実験方法

イ. 腫瘍細胞の維持

Walker256 細胞は Wistar/S 系ラット (6 ~ 9 週令、♀) の腹腔中に $3 \sim 5 \times 10^6$ 個を投与して、7 日毎に継代した。

S-180 細胞は ICR マウス (4 ~ 6 週令、♂) の腹腔中に $2 \sim 5 \times 10^6$ 個を投与して、7 日毎に継代した。

ロ. 担癌動物の作製

Wistar/S 系ラット (6 週令、♀) の鼠径部皮下に腫瘍細胞 1.0×10^7 個を移植し、6 日後に Walker256 担癌ラットとして実験に用いた。

ICR マウス (4 週令、♂) の鼠径部皮下に腫瘍細胞 1.5×10^6 個を移植し、10 日後に S-180 担癌マウ

スとして実験に用いた。

ハ．体内分布実験

(Walker256 担癌ラット)

実験は $18.0 \mu\text{g}/\text{Kg}$ 投与で6時間までと $10 \text{mg}/\text{Kg}$ 投与で24時間までの二通りを行った。軽くエーテル麻酔を施した担癌ラットの頸静脈より検体を投与し、所定時間後に軽くエーテル麻酔を行い採血し、検体の血漿中濃度を調べた。なお $18.0 \mu\text{g}/\text{Kg}$ 投与では6時間後に、 $10 \text{mg}/\text{Kg}$ 投与では24時間後にそれぞれラットを放血死させて検体の腫瘍内濃度及び血漿中濃度を調べた。

(S-180 担癌マウス)

担癌マウスの尾静脈より検体を投与し ($18.0 \mu\text{g}/\text{Kg}$)、4時間後にマウスを放血死させて検体の腫瘍内濃度及び血漿中濃度を調べた。

腫瘍内濃度及び血漿中濃度はそれぞれ組織及び血漿を燃焼装置を用いて燃焼し、放射活性を液体シンチレーション法にて測定して求めた。

(3) 結果

結果を第1図、第2図、表2、表3に示す。

第1図および第2図はWalker256 担癌ラットについてそれぞれ $18.0 \mu\text{g}/\text{Kg}$ 投与の場合および $10 \text{mg}/\text{Kg}$ 投与の場合の血漿中濃度の経時変化を示すグラフである。図中▲印線および○印線はそれぞれ検体1及び検体2に

おける結果を表す。

第1図および第2図より、本発明物質が血中から急速に消失されることはなく、消失速度は小さいことが認められる。

表2および表3はそれぞれ検体1および検体2についての記載の時点における腫瘍内濃度、血漿中濃度および腫瘍組織のKp値（表中において単にKp値と略記する）を示す。なおKp値は次式によって計算される。

$$Kp \text{ 値} = \text{組織 1 g あたりの検体濃度} / \text{血漿 1 ml あたりの検体濃度}$$

表2および表3より、本発明物質は癌組織への指向性を有することが認められる。

表 2

	腫瘍内濃度 (ng/g)	血漿中濃度 (ng/ml)	K p 値
S-180 担癌マウス			
(18.0 μ g/Kg、4時間)	7.60 \pm 0.49	2.36 \pm 0.086	3.25 \pm 0.30
Walker256 担癌ラット			
(18.0 μ g/Kg、6時間)	24.4 \pm 3.83	14.1 \pm 1.72	1.73 \pm 0.093
Walker256 担癌ラット			
(10mg/Kg、24時間)	19.210 \pm 630	575 \pm 102	35.7 \pm 6.31

- 34 -

表 3

	腫瘍内濃度 (ng/g)	血漿中濃度 (ng/ml)	K p 値
S-180 担癌マウス (18.0 μ g/Kg、4時間)	5.10 \pm 0.43	22.5 \pm 1.16	0.226 \pm 0.016
Walker256 担癌ラット (18.0 μ g/Kg、6時間)	26.7 \pm 2.35	97.5 \pm 5.78	0.274 \pm 0.017
Walker256 担癌ラット (10mg/Kg、24時間)	11.050 \pm 619	12.610 \pm 1.110	0.891 \pm 0.094

実験例 2

(Schiff 塩基型結合によるカルボキシメチルマンノグルカン - ダウノルビシン複合体の合成)

実施例 4 で得られた CM-4 200 mg を水 40 ml に溶解した。これに過ヨウ素酸ナトリウム 21 mg (糖残基 1 モルあたり 0.1 モルに相当) を少量の水に溶かしたものを氷冷下攪拌しながら加えた。室温で 25 時間反応させた後に、水に対して透析し、その内液に酢酸ナトリウム 200 mg を加え、エタノール 350 ml 中へ滴下した。析出した沈殿を集め、乾燥し、アルデヒド化したカルボキシメチルマンノグルカン 192 mg を得た。このうちの 20 mg に 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.0) 4 ml を加えて溶解した。これにダウノルビシン塩酸塩 16.9 mg をエタノール 4 ml 及び 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.0)

400 μ l に溶かした溶液を加え、室温にて一晩反応させた後、反応液にエタノール 12 ml を加え、析出した沈殿を集め、乾燥し、シッフ塩基型で結合したカルボキシメチルマンノグルカン - ダウノルビシン複合体 18 mg を得た。この複合体は水溶性であり、ダウノルビシンの含有量は 10.5% (重量%) であった。第 3 図に紫外・可視部吸収スペクトル (濃度: 200 μ g/ml、溶媒: 水) を示す。

実験例 3

(アミド結合を介したカルボキシメチルマンノグルカン - ダウノルビシン複合体の合成)

実験例 4 で得られた CM-4 20 mg を 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.0) 6 ml に溶解した。これにダウノルビシン塩酸塩 5.6 mg をエタノール 4 ml 及び 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.0) 1 ml に溶かした溶液を加え、更に 1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 60 mg を水 1 ml に溶かした溶液を加え、室温にて一晩反応させた後、反応液にエタノール 24 ml を加え、析出した沈殿を集め、乾燥し、カルボキシル基にアミド結合で結合したカルボキシメチルマンノグルカン - ダウノルビシン複合体 20 mg を得た。この複合体は水溶性であり、ダウノルビシンの含有量は 5.3% (重量%) であった。第 4 図に紫外・可視部吸収スペクトル (濃度: 500 μ g/ml、溶媒: 水) を示す。

実施例 7

マンノグルカン (3.00 g) を実施例 4 の方法に準じてカルボキシメチル化して、3.25 g の CM-4 (置換度: 0.53) を得た。この CM-4 (2.00 g) を実施例 5 の方法に準じて更にカルボキシメチル化して、2.22 g の CM-5 (置換度: 0.79) を得た。この CM-5 (1.00 g) を実施例 6 の方法に準じて更にカルボキシメチル化して、1.08 g の CM-6 (置換度: 1.0) を得た。

実施例 8

実施例 7 で得た CM-6 (500 mg) を 2-プロパノール (30 ml) に懸濁し、これに 1 g の水酸化ナトリウムを 3 ml の水にとかして得られる溶液の全量を滴下した後、モノクロル酢酸 (1 g) を加え、室温で 2 時間攪拌しながら反応させた。この反応混合物中の沈殿を集め、2-プロパノール (40 ml) / 水酸化ナトリウム (1 g) - 水 (2 ml) / モノクロル酢酸 (1 g) を用いて、再び室温で 20 時間反応させた。この反応混合物中の沈殿を集め、水 (40 ml) に溶解後、メタノール (240 ml) 中に注加して生成した沈殿を集め、メタノールで洗い、真空乾燥して 620 mg の CM-7 (置換度: 2.1) を得た。

実施例 9

マンノグルカン (4.00 g) を 0.1 N 塩酸

- 37 -

(160 ml) に溶解し、80℃で5時間酸分解した後、5 N 水酸化ナトリウムで中和した。この溶液をエタノール (500 ml) 中に注加し、生成した沈殿を集め、エタノールで洗った後、水 (250 ml) に溶解した。この溶液をDowex 50W-X2(H^+) とDowex 1-X2(Cl^-) の両カラム (各1.5×20 cm) に通し、通過液を約150 mlまで濃縮した後、エタノール (500 ml) 中に注加し、生成した沈殿を集め、エタノールで洗い、真空乾燥して3.48 gの低分子マンノグルカンを得た。

この3.30 gを1 M塩化ナトリウム (330 ml) に溶解し、メタノール (330 ml) を加え、これを遠心分離して得られた上清にメタノール (110 ml) を加え、生成した沈殿を集めた。この沈殿を水 (50 ml) に溶解し、エタノール (200 ml) 中に注加し、生成した沈殿を集め、エタノールで洗い、真空乾燥して1.92 gの低分子マンノグルカン (MG15) を得た。MG15の分子量 (ゲル濾過法 / 標準物質: デキストラン、カラム: G4000PW_{XL}) は約 1.5×10^5 であった。

実施例 10

マンノグルカン (7.00 g) を0.1 N塩酸 (280 ml) に溶解し80℃で7.5時間酸分解した後、5 N 水酸化ナトリウムで中和した。この溶液をエタノール (900 ml) 中に注加し、生成した沈殿を集め、エタノールで洗った後、水 (450 ml) に溶解した。この溶

- 38 -

液をDowex 50W-X2(H^+)とDowex 1-X2(Cl^-)の両カラム(各 $2 \times 20\text{ cm}$)に通し、通過液を約 250 ml まで濃縮した後、エタノール(850 ml)中に注加し、生成した沈殿を集め、エタノールで洗い、真空乾燥して

6.02 gの低分子マンノグルカンを得た。

この3.98 gを1 M塩化ナトリウム(400 ml)に溶解し、これにメタノール(533 ml)を加え、生成した沈殿を遠心分離により集めた。この沈殿を水(100 ml)に溶解した後、エタノール(400 ml)中に注加し、生成した沈殿を集め、エタノールで洗い、真空乾燥して2.00 gの低分子マンノグルカン(MG10)を得た。また、上記遠心分離の上清にメタノール(267 ml)を加え、生成した沈殿を集めた。この沈殿を水(60 ml)に溶解し、エタノール(240 ml)中に注加し、生成した沈殿を集め、エタノールで洗い、真空乾燥して

1.26 gの低分子マンノグルカン(MG4)を得た。

MG10とMG4の分子量(ゲル濾過法/標準物質:デキストラン、カラム:G4000PW_{XL})は、各々約 1×10^5 と約 4×10^4 であった。

実施例 11

実施例9で得たMG15(1.50 g)を実施例4の方法に準じてカルボキシメチル化して、1.80 gのMG15-CM-4(置換度:0.52)を得た。この1.40 gを実施例5の方法に準じて更にカルボキシメ

- 39 -

チル化して、1.54 g の MG 15 - CM - 5 を得た。
この MG 15 - CM - 5 (1.00 g) を実施例 6 の方法に準じて更にカルボキシメチル化して1.08 g の MG 15 - CM - 6 (置換度 : 1.0) を得た。

実施例 1 2

実施例 1 0 で得た MG 1 0 (1.80 g) を実施例 4 の方法に準じてカルボキシメチル化して、2.23 g の MG 1 0 - CM - 4 を得た。この2.00 g を実施例 5 の方法に準じて更にカルボキシメチル化して、2.25 g の MG 1 0 - CM - 5 を得た。この MG 1 0 - CM - 5 (1.0 g) を実施例 6 の方法に準じて更にカルボキシメチル化して1.07 g の MG 1 0 - CM - 6 (置換度 : 1.0) を得た。

実施例 1 3

実施例 1 0 で得た MG 4 (500 mg) を実施例 4 と同様の方法でカルボキシメチル化して、594 mg の MG 4 - CM - 4 (置換度 : 0.54) を得た。

実施例 1 4

マンノグルカン (1.50 g) を水 (150 ml) に溶解した後、8.5% 過ヨウ素酸ナトリウム水溶液 (70 ml) を加え、遮光下、室温で64時間反応させた。この反応液にエチレングリコール (1.7 g) を加え、室温で2時間放置した後、水に対し透析し、この内液に水素化ホウ素ナトリウム (0.75 g) を加え、室温で一晩

反応させた。この反応液のpHを酢酸で5に調整し、次いで、2N水酸化ナトリウムで7とした後、水に対して透析した。この内液を約10mlまで濃縮後、エタノール(40ml) - アセトン(80ml)の混液中に注加し、生成した沈殿を集め、アセトンで洗い、真空乾燥して、1.29gのマンノグルカンポリアルコール(MG-PA)を得た。

このMG-PA(500mg)に水(1ml)と水酸化ナトリウム(2.0g)を冷却下に加えて、透明な溶液を得た。この溶液にモノクロル酢酸(2.9g)を加え、室温で18時間反応させた。反応液のpHを酢酸で8に調整した後、エタノール(200ml)中に注加して生成した沈殿を集めた。この沈殿を水(5ml)に溶解させ、メタノール(125ml)中に注加し、生成した沈殿を集め、メタノールで洗った後、真空乾燥して、459mgのカルボキシメチル化体を得た。この400mgを2-プロパノール(40ml)に懸濁し、これに0.8gの水酸化ナトリウムを1.6mlの水にとかして得られる溶液の全量を滴下した後、モノクロル酢酸(0.8g)を加え、室温で20時間攪拌しながら反応させた。この反応混合物中の沈殿を集め、水(8ml)に溶解後、メタノール(200ml)中に注加し、生成した沈殿を集め、メタノールで洗い、真空乾燥して631mgのカルボキシメチル化マンノグルカンポリアルコール(MG-PA-CM)を得た。

を得た。MG-PA-CMの置換度(DS)を実施例1と同様にして測定したところ4糖当たり、9であった。ただし、4糖当りのDSは次式によって求めた。

$$DS = 59.4 (A - B) / [S - 5.8 (A - B)]$$

実施例 15

実施例7で得た50mgのCM-5と50mgの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)とを水(10ml)に溶解した後、氷冷した。4mgのマイトマイシンC(MMC)を0.8mlの水-エタノール(1:1, v/v)に溶解したものを別に用意し、この全量を上記の氷冷液に加え、0.2N塩酸で反応液のpHを5~6に維持しながら氷冷下、1時間反応させた。この反応液のpHを0.2N水酸化ナトリウムで7.6に調整した後、エタノール(50ml)中に注加し、生成した沈殿を集め、95%エタノールで洗い、真空乾燥して、CM-5にMMCが結合した複合体(52mg)を得た。365nmにおける吸光度分析により求めたこの複合体のMMC含量は7.6%(重量%)であった。この複合体の紫外・可視部吸収スペクトル(濃度: 96 μ g/ml, 溶媒: 水-エタノール(7:3, v/v))を第5図として示す。

実施例 16

実施例15と同様の方法で、実施例7で得たCM-6(50mg)と、4mgのMMCとを50mgのEDCを用い

て反応させ、MMC含量が7.3%（重量%）の複合体（50 mg）を得た。

実施例 17

実施例 15と同様の方法で、実施例 8で得たCM-7（50 mg）と、10 mgのMMCとを150 mgのEDCを用いて反応させ、MMC含量が14%（重量%）の複合体（57 mg）を得た。

実施例 18

実施例 15と同様の方法で、実施例 14で得たMG-PA-CM（30 mg）と、10 mgのMMCとを150 mgのEDCを用いて反応させ、MMC含量が24%（重量%）の複合体（31 mg）を得た。この複合体の紫外・可視部吸収スペクトル（濃度：42 μ g/ml，溶媒：水-エタノール（7：3，v/v））とゲル濾過クロマトグラムは各々第6図、第7図に示されるとおりである。

実施例 19

実施例 15と同様の方法で、実施例 11で得たMG-15-CM-4（50 mg）と、4 mgのMMCとを50 mgのEDCを用いて反応させ、MMC含量が7.2%（重量%）の複合体（53 mg）を得た。

実施例 20

実施例 15と同様の方法で、実施例 11で得たMG-15-CM-6（50 mg）と、10 mgのMMCとを150 mgのEDCを用いて反応させ、MMC含量が15

%（重量％）の複合体（48 mg）を得た。

実施例 2 1

実施例 1 5 と同様の方法で、実施例 1 2 で得た M G 1 0 - C M - 6（50 mg）と、10 mg の M M C とを 150 mg の E D C を用いて反応させ、M M C 含量が 17 %（重量％）の複合体（55 mg）を得た。

実施例 2 2

実施例 1 5 と同様の方法で、実施例 1 3 で得た M G 4 - C M - 4（50 mg）と、4 mg の M M C とを 50 mg の E D C を用いて反応させ、M M C 含量が 7.4 %（重量％）の複合体（46 mg）を得た。

実施例 2 3

実施例 4 の方法に準じて得られた C M - 4（置換度 0.53、1.25 g）を水（300 ml）に溶解した。この溶液を、過ヨウ素酸ナトリウム 3.32 g（糖残基 1 モル当り 3 モル当量）を水（200 ml）に溶解した水溶液と混合した。室温で 1 日反応させた後、1 g のエチレングリコールを加え、4 時間反応させた。水に対して透析し、内液を濃縮した後、エタノール-アセトン混液（約 1 : 1）を加え、酢酸ナトリウム飽和メタノール（15 ml）を攪拌下にて滴下し、析出した沈殿を集め、アルデヒド化したカルボキシメチルマンノグルカン 1.11 g を得た。この 800 mg を 0.1 M ホウ酸緩衝液（pH = 8.0、250 ml）に溶解し、ダウノルビシ

ン塩酸塩 130 mg を含むエタノール溶液 160 ml と混合し、室温で 16 時間攪拌した。3 M 塩化ナトリウム溶液 (8 ml) を加えた後濾過し、エタノールと混合して析出した沈殿を集めて 677 mg のカルボキシメチルマンノグルカン-ダウノルビシン複合体を得た。この複合体は水溶性であり、ダウノルビシン含量は 10 % (重量%) であった。この複体の紫外・可視部吸収スペクトル (濃度 ; 330 μ g/ml、溶媒 : 水) は第 8 図に示されたとおりである。

実施例 24

実施例 7 で得られた CM-6 (800 mg) を水 (200 ml) に溶解した。この溶液を過ヨウ素酸ナトリウム 2.12 g (糖残基 1 モル当り 3 モル当量) を水 (30 ml) に溶解した水溶液と混合した。室温で 1 日反応させた後、620 mg のエチレングリコールを加え、4 時間反応させた。水に対して透析し、内液を濃縮した後、エタノール-アセトン混液 (約 1 : 1) を加え、酢酸ナトリウム飽和メタノール (10 ml) を攪拌下にて滴下し、析出した沈殿を集め、アルデヒド化したカルボキシメチルマンノグルカン 643 mg を得た。この 600 mg を 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH = 8.0、175 ml) に溶解し、ダウノルビシン塩酸塩 150 mg を含むエタノール溶液 110 ml と混合し、室温で 16 時間攪拌した。3 M 塩化ナトリウム溶液 (4.5 ml) を加えた後濾過し、エ

タノールと混合して析出した沈殿を集めて610 mgのカルボキシメチルマンノグルカン-ダウノルビシン複合体を得た。この複合体は水溶性であり、ダウノルビシン含量は13% (重量%) であった。この複合体の紫外・可視部スペクトル (濃度: 200 μ /ml、溶媒: 水) は第9図に示されるとおりである。

実施例 25

実施例 12 で得られた MG10-CM-6 (700 mg) を水 (175 ml) に溶解した。この溶液を、過ヨウ素酸ナトリウム 1.86 g (糖残基 1 モル当たり 3 モル当量) を水 (25 ml) に溶解した水溶液と混合した。室温で 1 日反応させた後、560 mgのエチレングリコールを加え、4 時間反応させた。水に対して透析し、内液を濃縮した後、エタノール-アセトン混液 (約 1 : 1) を加え、酢酸ナトリウム飽和メタノール (8 ml) を攪拌下にて滴下し、析出した沈殿を集め、アルデヒド化したカルボキシメチルマンノグルカン 571 mgを得た。この 571 mgを 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH = 8.0、180 ml) に溶解し、ダウノルビシン塩酸塩 143 mgを含むエタノール溶液 112 mlと混合し、室温で 16 時間攪拌した。3 M 塩化ナトリウム溶液 (3 ml) を加えた後濾過し、エタノールと混合して析出した沈殿を集めて 610 mgのカルボキシメチルマンノグルカン-ダウノルビシン複合体を得た。この複合体は水溶性であり、ダウノルビシン含量は

12% (重量%) であった。この複合体の紫外・可視部スペクトル (濃度: $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、溶媒: 水) は第10図に示されるとおりである。

実施例 26

白金錯体 シス - ジニトラートジアンミン白金 (II) は公知の方法 (例えば、Inorg.Chem., Vol16, P1525 (1977), B.Lippert et al.) で合成した。

実施例 14 で得た MG - PA - CM (230 mg) を水 (7 ml) に溶解し、これに シス - ジニトラートジアンミン白金 (II) (24.71 mg) を水 (7 ml) に溶解した溶液を加え、遮光下、室温で24時間攪拌した。未反応原料白金錯体が残存していないことをゲル濾過クロマトグラフィーで確認した後、反応液を水に対して1夜透析した。内液を 1 N NaOH を用いて pH を 6.5 に調整した後、約 10 ml に濃縮し、次いでエタノール (80 ml) を加え、析出した沈殿物を集め、真空乾燥して、シス - ジアンミン白金 (II) 錯体複合体 (218 mg 、白金含量 (原子吸光法による) : 5.90%) を得た。この複合体のゲル濾過溶出パターン (検出: 280 nm における紫外部吸収) を第11図として示す。

実施例 27

実施例 7 で得た CM - 6 (14.6 mg) と、シス - ジニトラートジアンミン白金 (II) (2.12 mg) とより、実施例 26 と同様にして、シス - ジアンミン白金 (II)

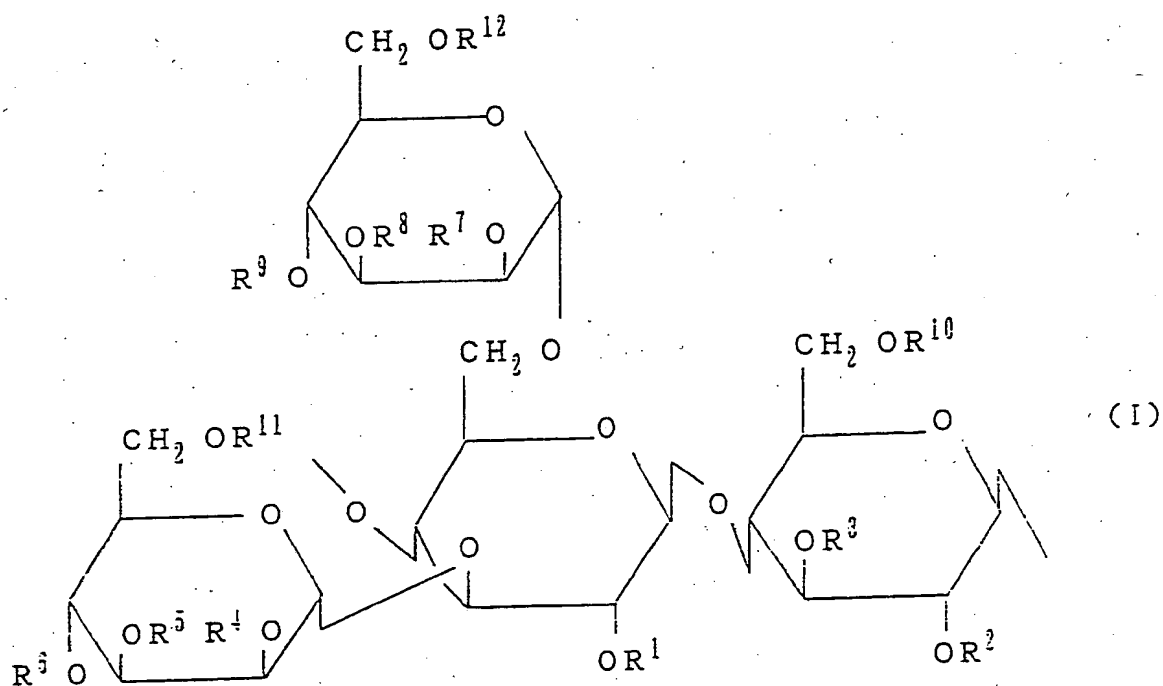
錯体複合体（12.6 mg、白金含量：7.04%）を得た。

実施例 28

実施例 8 で得た CM-7（211 mg）と、シス-ジニトラートジアンミン白金（II）（24.7 mg）とより、実施例 26 と同様にして、シス-ジアンミン白金（II）錯体複合体（205 mg、白金含量：6.60%）を得た。

請求の範囲

1. 下記的一般式(I)で表わされるテトラサッカライド単位から構成される、カルボキシメチルマンノグルカン及びその塩。



(式中、

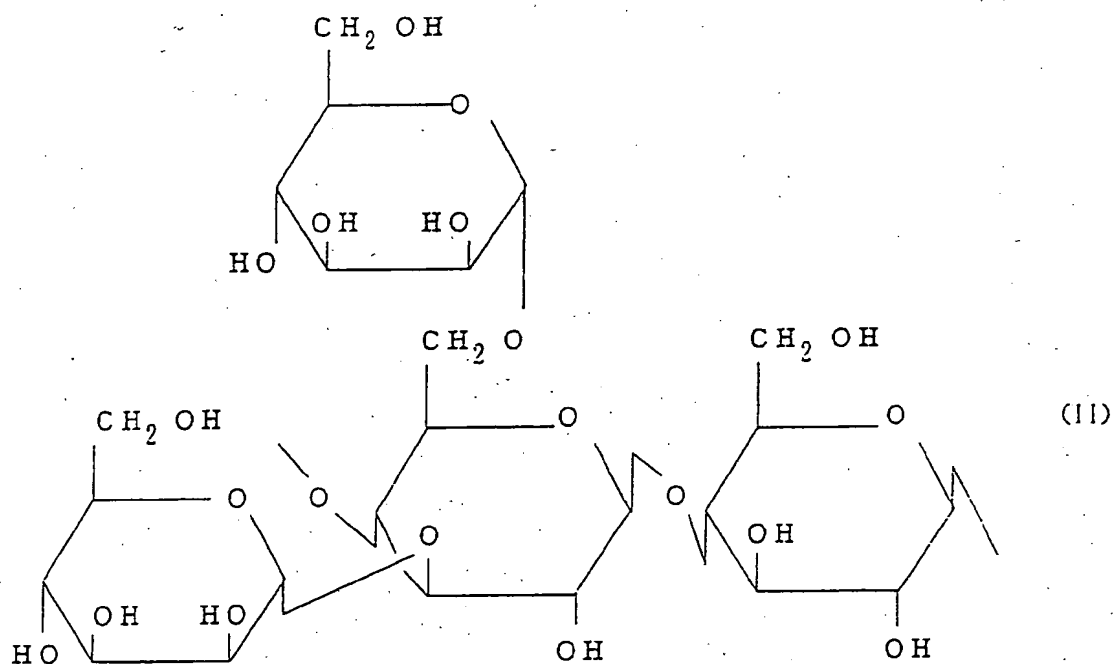
R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹、R¹⁰、R¹¹及びR¹²は、同一又は異なっているとしてもよく、それぞれ水素原子又はCH₂COOHを表わす。)

2. 分子量が1万～200万である、請求項1記載のカルボキシメチルマンノグルカン。

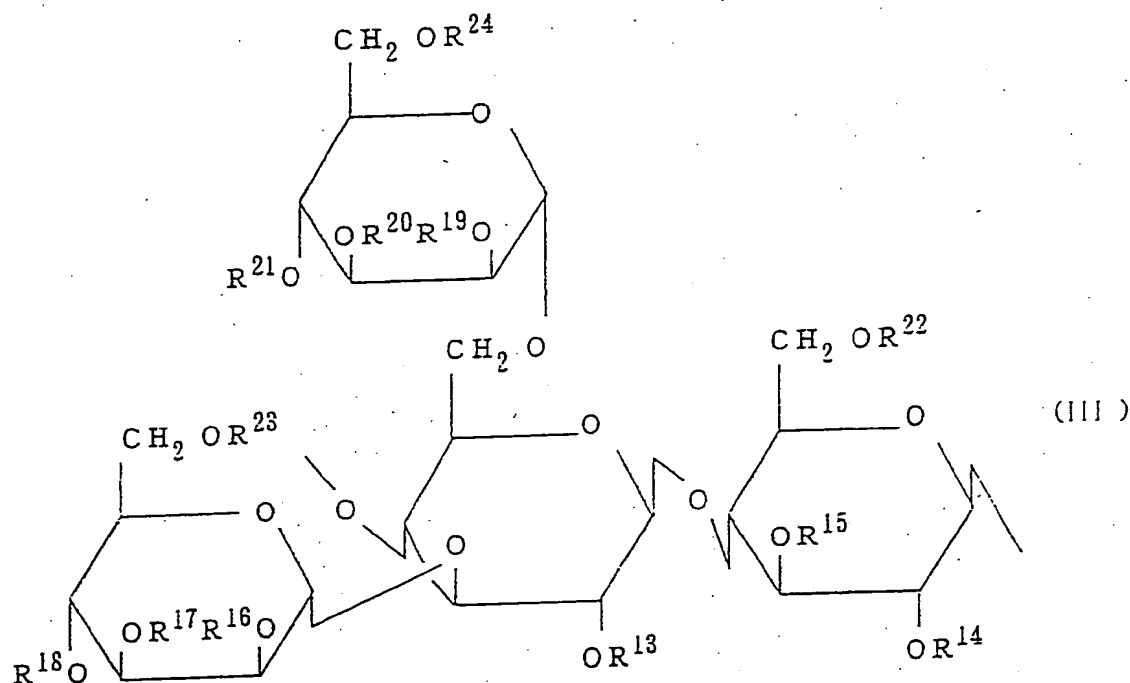
3. 一糖残基あたりのカルボキシメチル基の数とし

て定義される置換度が 0.01 ~ 3.0 である、請求項 1 又は 2 記載のカルボキシメチルマンノグルカン。

4. 下記式 (II) で表わされるテトラサッカライド単位から構成されるマンノグルカンにハロゲン化酢酸を反応させることからなる、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載のカルボキシメチルマンノグルカンの製造法。



5. 下記の一般式 (III) で表わされるテトラサッカライド単位から構成される、カルボキシメチルマンノグルカン誘導体及びその塩。



(式中、

R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} 、 R^{16} 、 R^{17} 、 R^{18} 、 R^{19} 、 R^{20} 、 R^{21} 、 R^{22} 、 R^{23} 及び R^{24} は、水素原子、 CH_2COOH 、 $CH_2CONR^{*1}R^{*2}$ （ここで $NR^{*1}R^{*2}$ は、一般式 $HNR^{*1}R^{*2}$ で表わされるアミノ基を有する医薬化合物のアミノ基から水素原子を一個除いた残基を表わす）、 CH_2COOR^{*3} （ここで OR^{*3} は、一般式 HOR^{*3} で表わされるアルコール性水酸基を有する医薬化合物のアルコール性水酸基から水素原子を除いた残基を表わす）、又は $CH_2COO \cdot 1/2 [Pt(NH_3)_2]$ （ここで Pt は二価の白金を表す）を表わす。

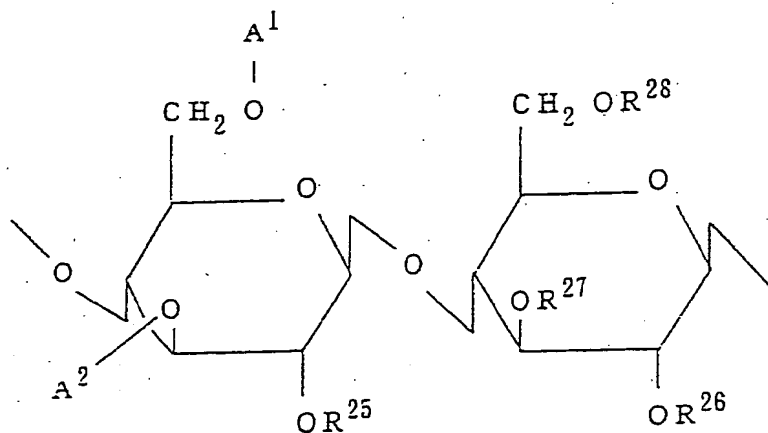
ただし、分子中の少なくとも1つの $R^{13} \sim R^{24}$ は
 $CH_2CONR^{*1}R^{*2}$ 、 CH_2COOR^{*3} 又は
 $CH_2COO \cdot 1/2 [Pt(NH_3)_2]$ を表わす。)

6. 分子量が1万～200万である、請求項5記載のカルボキシメチルマンノグルカン誘導体及びその塩。

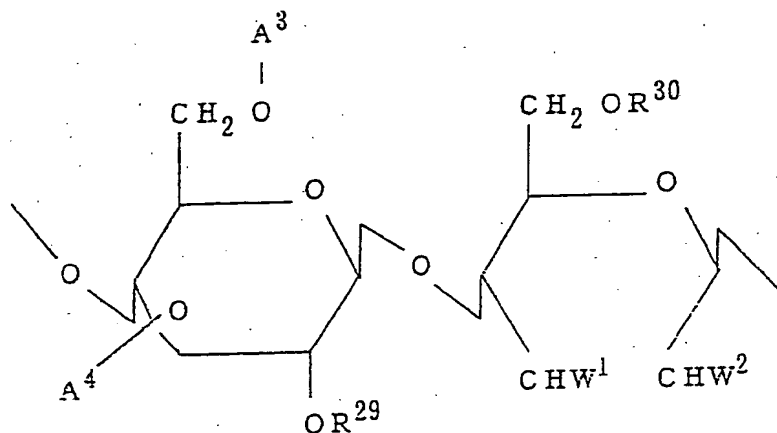
7. 一糖残基あたりのカルボキシメチル基の数として定義される置換度が0.01～3.0である、請求項5又は6記載のカルボキシメチルマンノグルカン誘導体及びその塩。

8. 請求項1記載の化合物又はその塩に、
 $HNR^{*1}R^{*2}$ 、 HOR^{*3} 又は $Pt(NH_3)_2$
 $(NO_3)_2$ を反応させることからなる、請求項5～7のいずれか一項記載のカルボキシメチルマンノグルカン誘導体及びその塩の製造法。

9. 下記的一般式(IV)で表わされる単位及び／又は下記的一般式(V)で表わされる単位から構成される、酸化カルボキシメチルマンノグルカン及びその誘導体並びにその塩。



(IV)



(V)

〔式中、

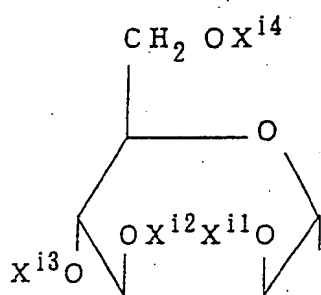
R^{25} 、 R^{26} 、 R^{27} 、 R^{28} 、 R^{29} 及び R^{30} は、同一又は異なっているもよく、それぞれ水素原子又は CH_2COOH を表わし、

W^1 及び W^2 はそれぞれ $=O$ 又は $=N-R^{*4}$ (ここで R は一般式 H_2N-R^{*4} で表わされるアミノ基を有する医薬化合物のアミノ基から水素原子を二個除いた残基を表わす) を表わし、

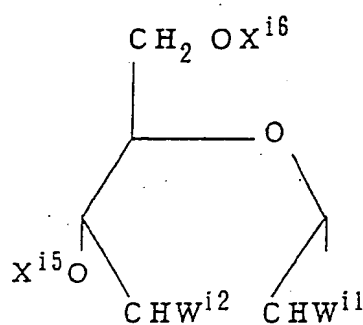
A^1 及び A^2 は、同一又は異なってもよく、それぞれ下記式 (VI)、式 (VII)、式 (VIII) 又は式 (IX) を表わし、

A^3 及び A^4 は、同一又は異なってもよく、それぞれ下記式 (VI)、(VII)、式 (VIII) 又は式 (IX) を表わすが、

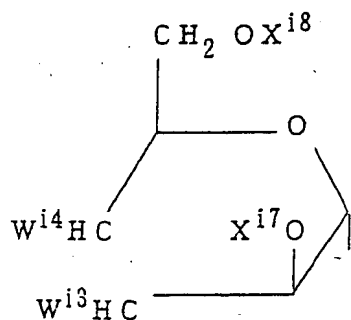
ただし、分子が前記一般式 (IV) のみからなる場合、分子中の A^1 及び A^2 の全てが式 (VI) を表わすことはない。



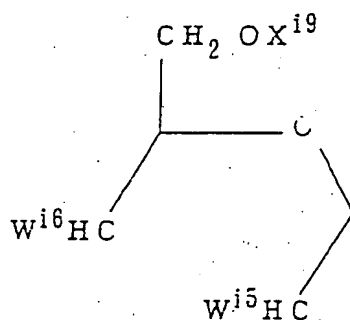
(VI)



(VII)



(VIII)



(IX)

(ここで、

X^{i1} 、 X^{i2} 、 X^{i3} 、 X^{i4} 、 X^{i5} 、 X^{i6} 、 X^{i7} 、 X^{i8} 及

び X^{i9} は、同一又は異なっているとしてもよく、それぞれ水素原子又は CH_2COOH を表わし、

W^{i1} 、 W^{i2} 、 W^{i3} 、 W^{i4} 、 W^{i5} 及び W^{i6} は同一又は異なっているとしてもよく、それぞれ $=O$ 又は $=N-R^*4$ (ここで $=N-R^*4$ は一般式 H_2N-R^*4 で表わされるアミノ基を有する医薬化合物のアミノ基から水素原子を二個除いた残基を表わす) を表わすが、

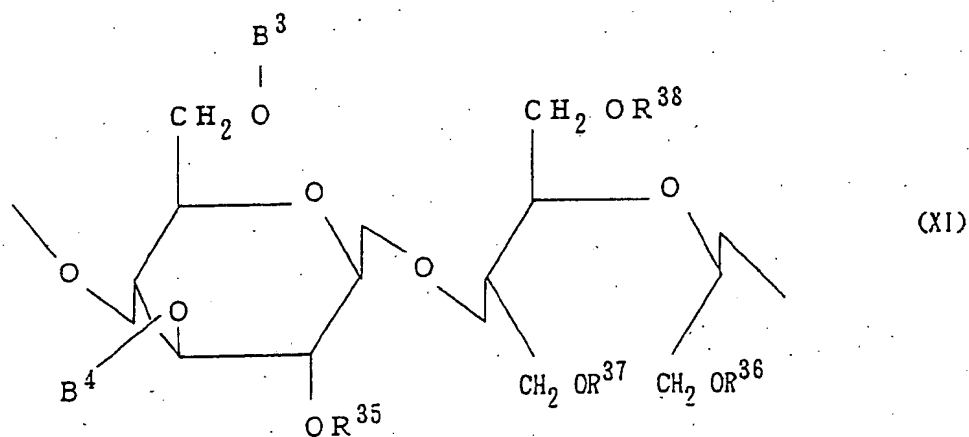
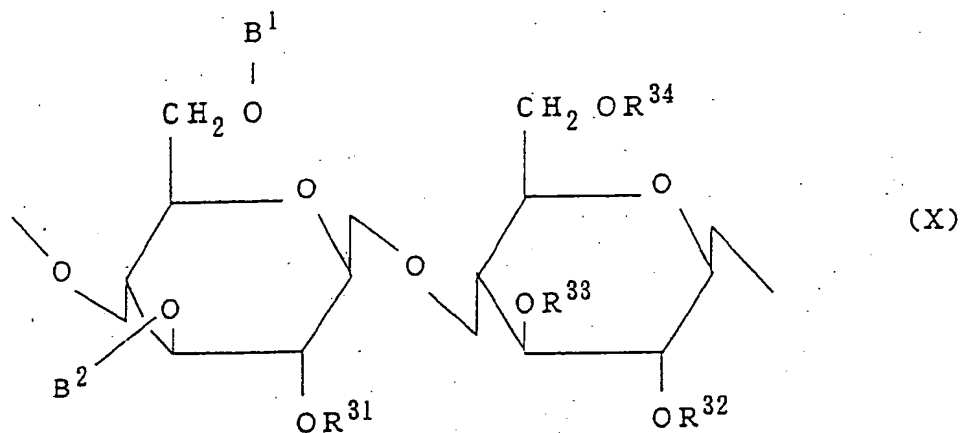
ただし、式 (VI)、式 (VII)、式 (VIII) 及び式 (IX) のそれぞれにおいて $X^{i1} \sim X^{i9}$ 及び $W^{i1} \sim W^{i6}$ の添字 i は 1 ~ 4 の整数を表わし、 A^1 、 A^2 、 A^3 及び A^4 のそれぞれを一般に A^i と記すものとする。)]

10. 分子量が 1 万 ~ 200 万である、請求項 9 記載の酸化カルボキシメチルマンノグルカン及びその誘導体並びにその塩。

11. 一糖残基あたりのカルボキシメチル基の数として定義される置換度が 0.01 ~ 3.0 である、請求項 9 又は 10 記載の酸化カルボキシメチルマンノグルカン及びその誘導体並びにその塩。

12. 請求項 4 で定義した式 (II) で表わされるテトラサッカライド単位から構成されるマンノグルカンにハロゲン化酢酸を反応させ、続いて過ヨウ素酸又はその塩を反応させることからなる、請求項 9 ~ 11 いずれか一項記載の酸化カルボキシメチルマンノグルカン及びその誘導体並びにその塩の製造法。

13. 下記的一般式(X)で表わされる単位及び／又は下記的一般式(XI)で表わされる単位から構成される、カルボキシメチル開環マンノグルカン及びその誘導体並びにその塩。



〔式中、

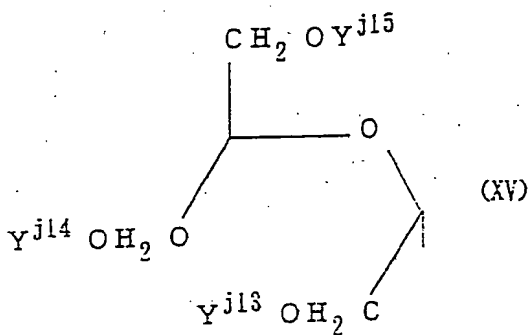
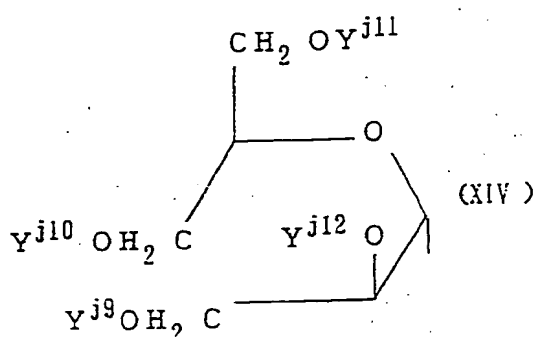
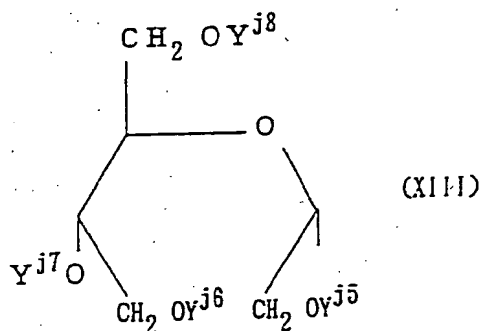
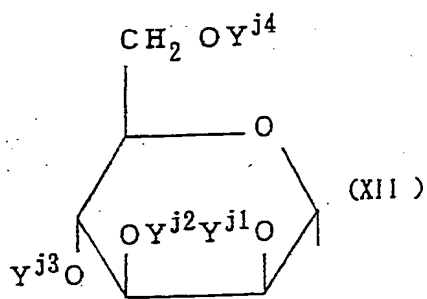
R^{31} 、 R^{32} 、 R^{33} 、 R^{34} 、 R^{35} 、 R^{36} 、 R^{37} 及び R^{38} は、同一又は異なっているがよく、それぞれ水素原子、 CH_2COOH 、 $CH_2CONR^{*1}R^{*2}$ 、

$\text{CH}_2 \text{COOR}^{*3}$ (ここで $\text{NR}^{*1} \text{R}^{*2}$ 及び OR^{*3} は請求項 5 で定義したのと同義である) 又は $\text{CH}_2 \text{COO} \cdot 1/2 [\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]$ (ここで Pt は二価の白金を表す) を表わし、

B^1 及び B^2 は同一又は異なっているとしてもよく、それぞれ下記式 (XII)、式 (XIII)、式 (XIV) 又は式 (XV) を表わし、

B^3 及び B^4 は同一又は異なっているとしてもよく、それぞれ下記式 (XIII)、式 (XIV) 又は式 (XV) を表わすが、

ただし、分子が前記一般式 (X) のみからなる場合、分子中の B^1 及び B^2 の全てが式 (XII) を表わすことはない。



(ここで、

Y^{j1} 、 Y^{j2} 、 Y^{j3} 、 Y^{j4} 、 Y^{j5} 、 Y^{j6} 、 Y^{j7} 、 Y^{j8} 、 Y^{j9} 、 Y^{j10} 、 Y^{j11} 、 Y^{j12} 、 Y^{j13} 、 Y^{j14} 及び Y^{j15} は、同一又は異なっているとしてもよく、それぞれ水素原子、 CH_2COOH 、 $CH_2CONR^{*1}R^{*2}$ 又は CH_2COOR^{*3} (ここで $NR^{*1}R^{*2}$ 及び OR^{*3} は請求項 5 で定義したのと同義である) または $CH_2COO \cdot 1/2 [Pt(NH_3)_2]$ (ここで Pt は二価の白金を表す) を表わし、

ただし、式 (XII)、式 (XIII)、式 (XIV) 及び式 (XV) のそれぞれにおいて $Y^{j1} \sim Y^{j15}$ の添字 j は 1 ~ 4 の整数を表わし、 B^1 、 B^2 、 B^3 及び B^4 のそれぞれを一般に B^j と記すものとする。)]

14. 分子量が 1 万 ~ 200 万である、請求項 13 記載のカルボキシメチル開環マンノグルカン及びその誘導体並びにその塩。

15. 請求項 4 で定義した式 (II) で表わされるテトラサッカライド単位から構成されるマンノグルカンに、過ヨウ素酸又はその塩を反応させ、続いて水素化ホウ素ナトリウムを反応させ、更にハロゲン化酢酸を反応させることからなる、請求項 13 又は 14 記載のカルボキシメチル開環マンノグルカン及びその誘導体並びにその塩の製造法。

1/7

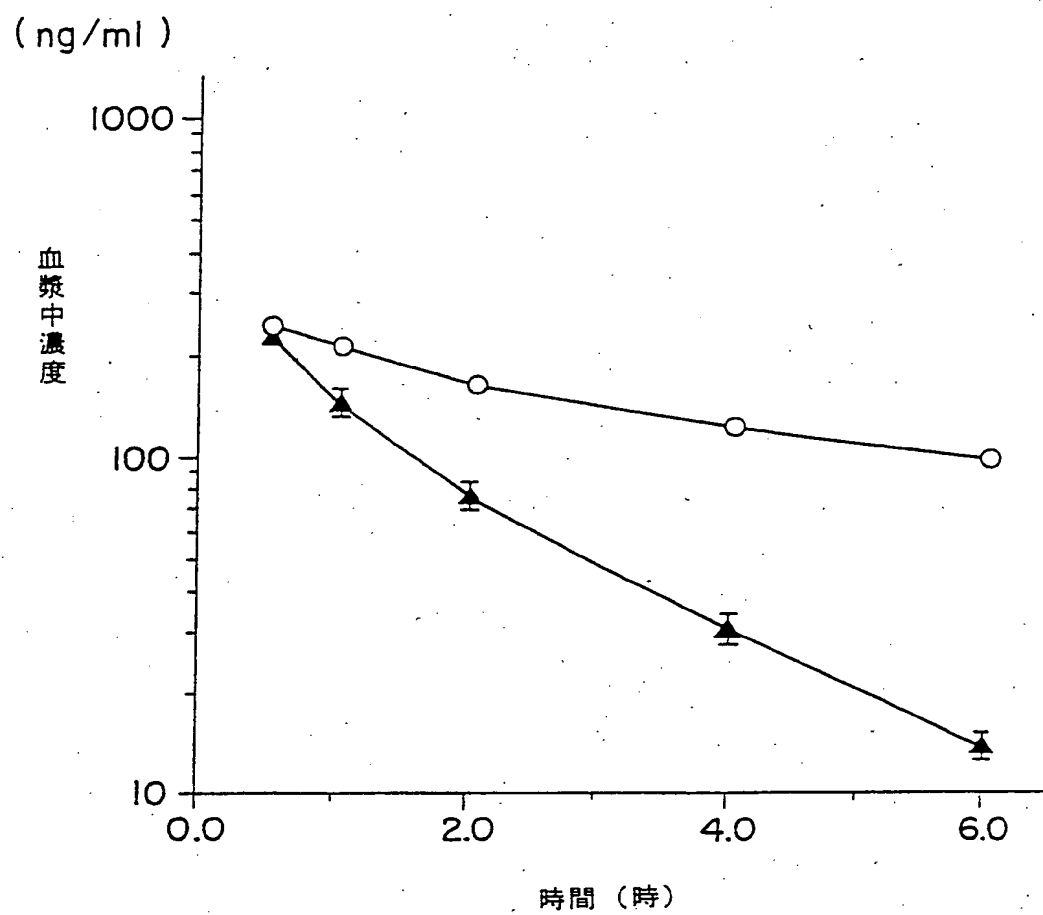


FIG. 1

2/7

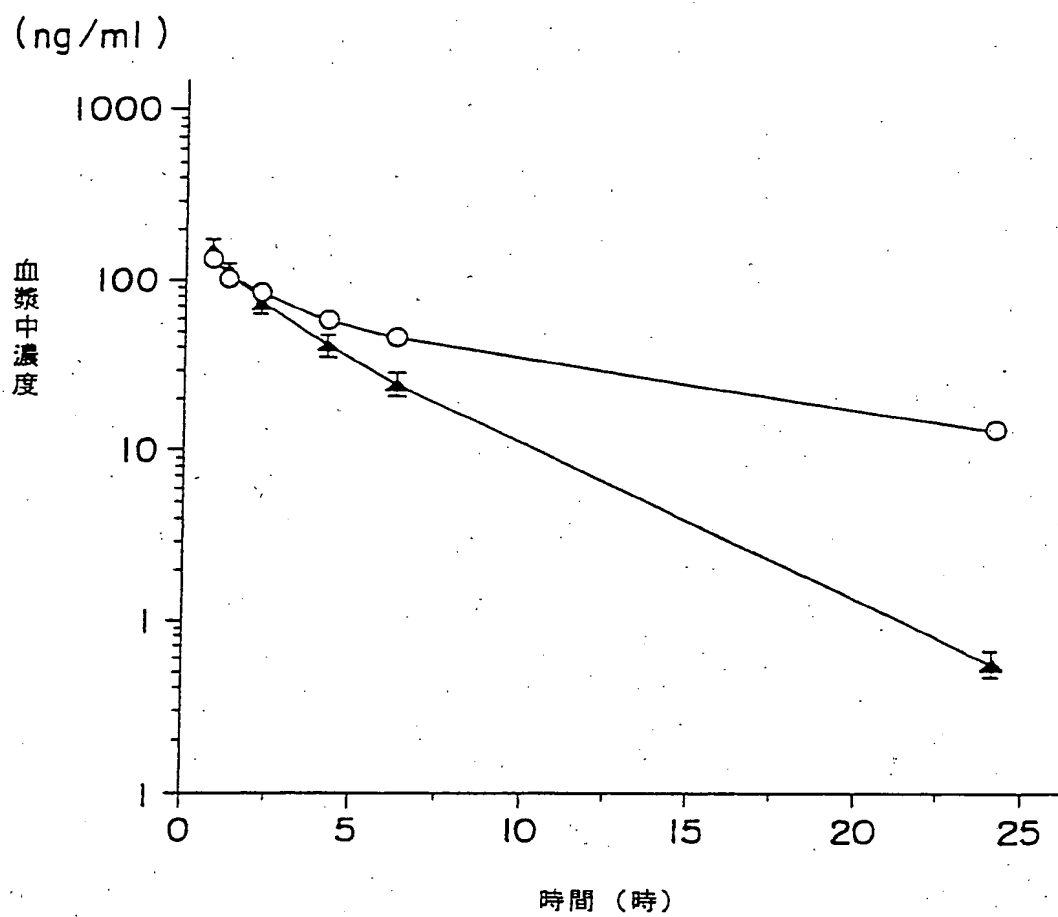


FIG. 2

3/7

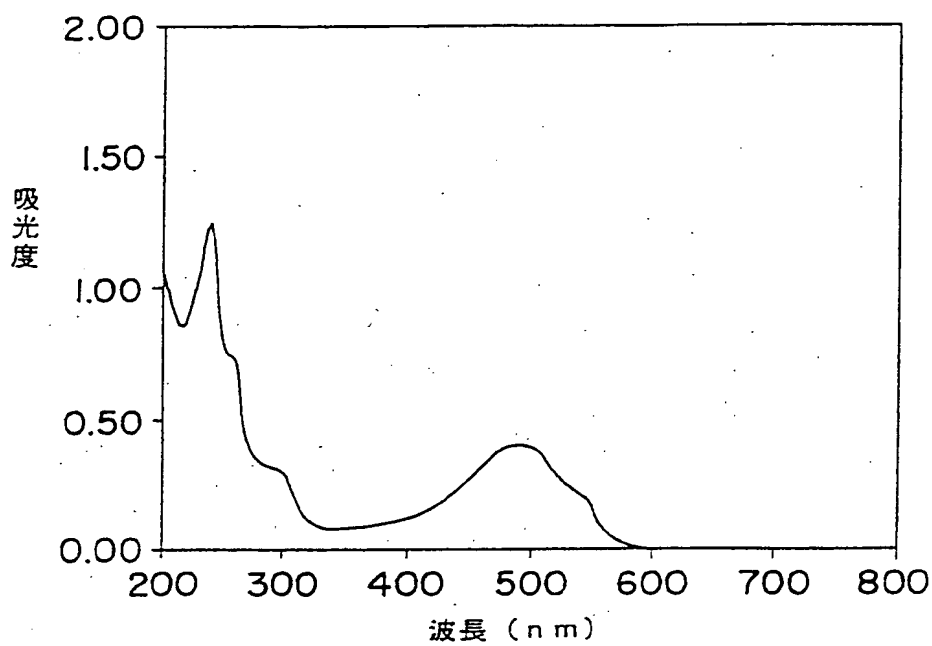


FIG. 3

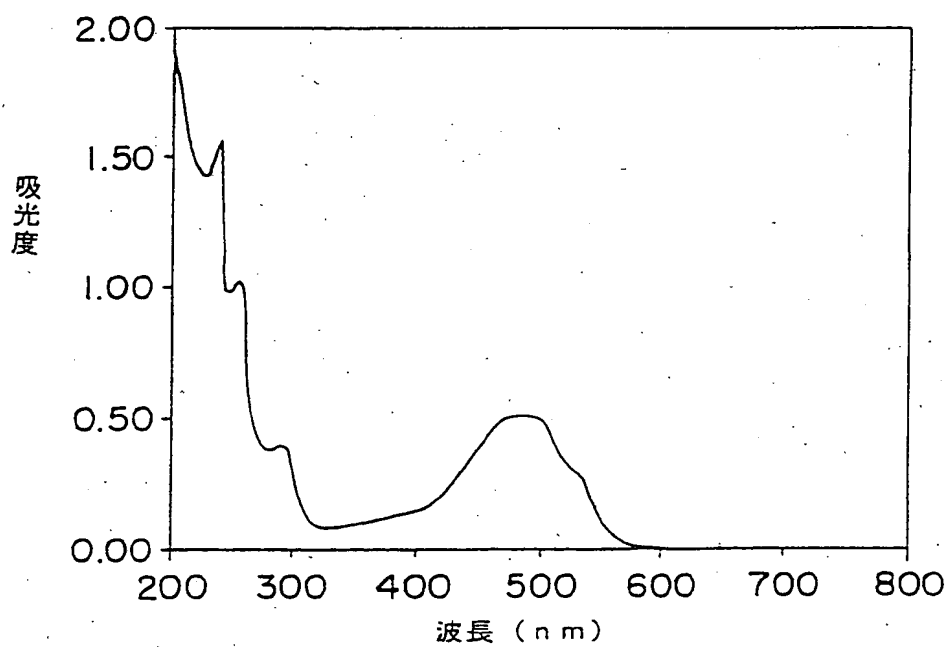


FIG. 4

4/7

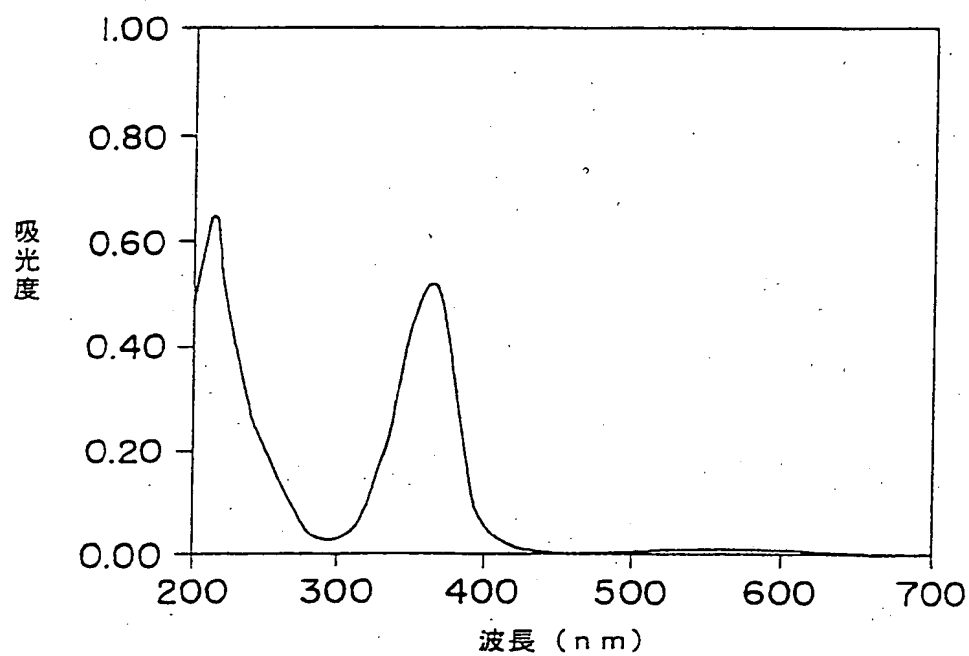


FIG. 5

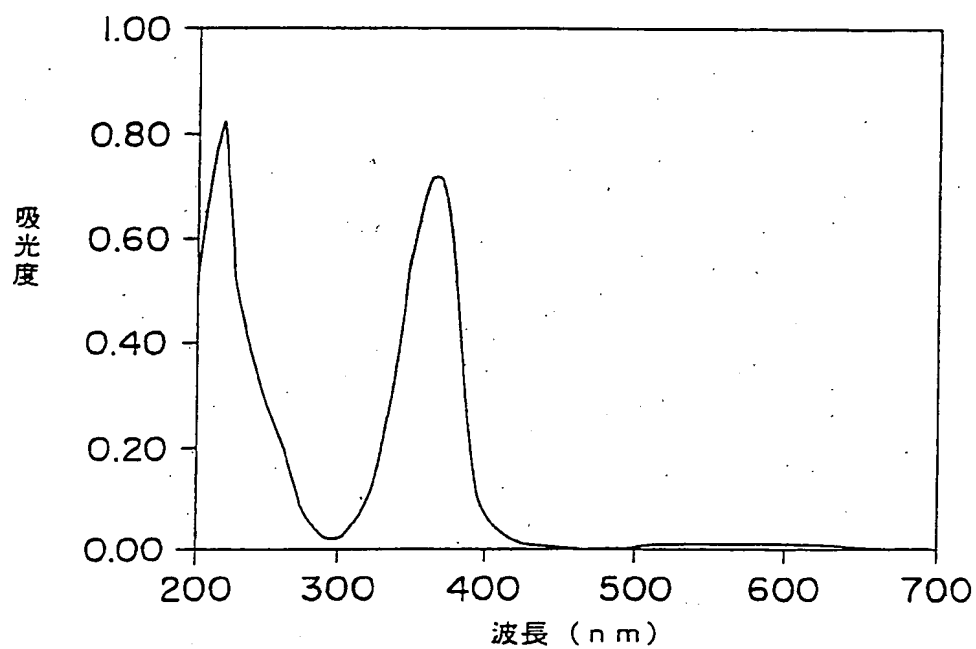


FIG. 6

5/7

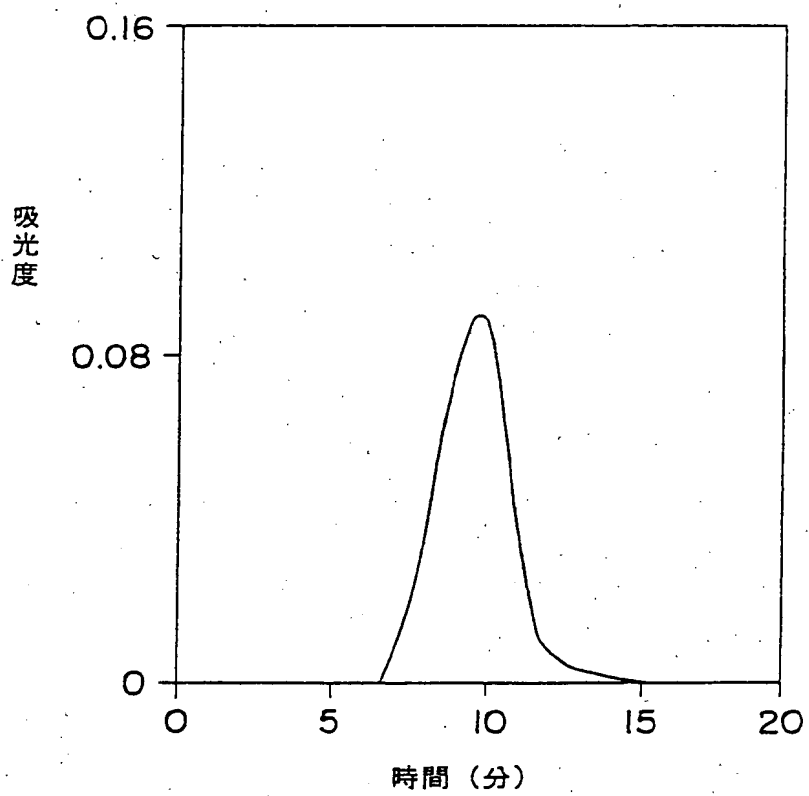


FIG. 7

6/7

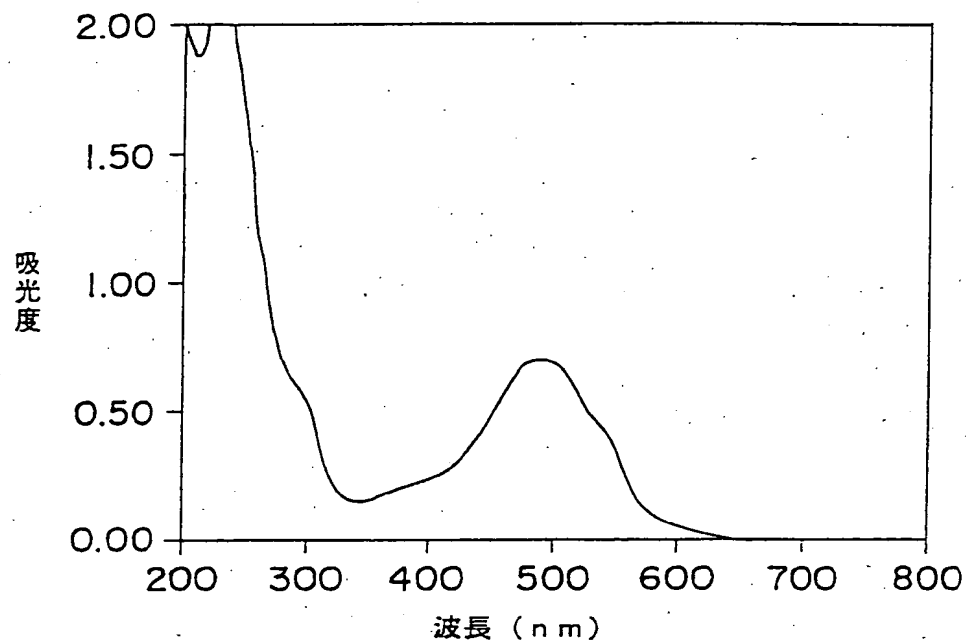


FIG. 8

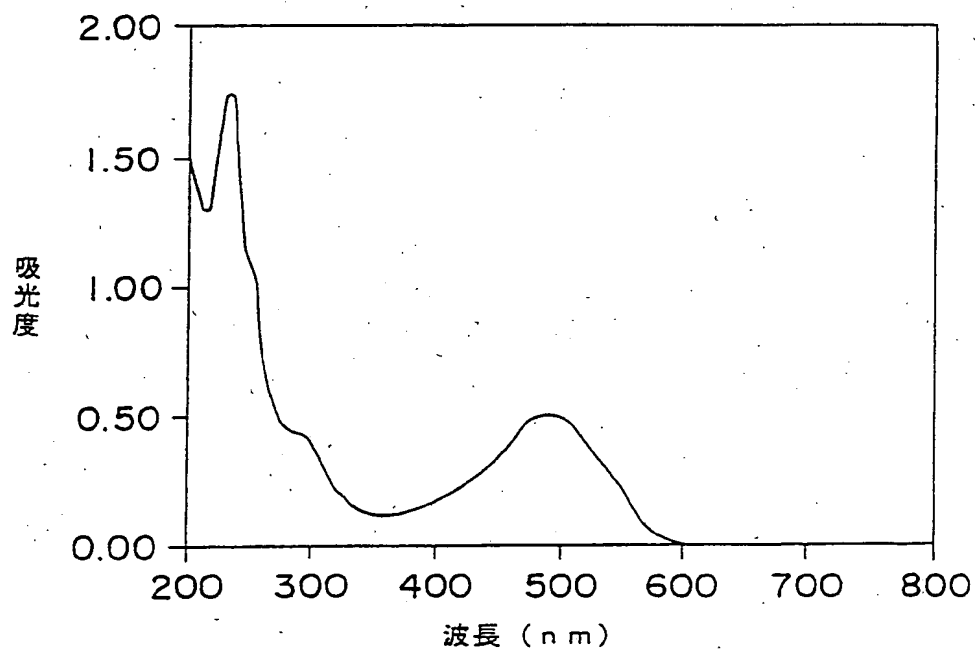


FIG. 9

7/7

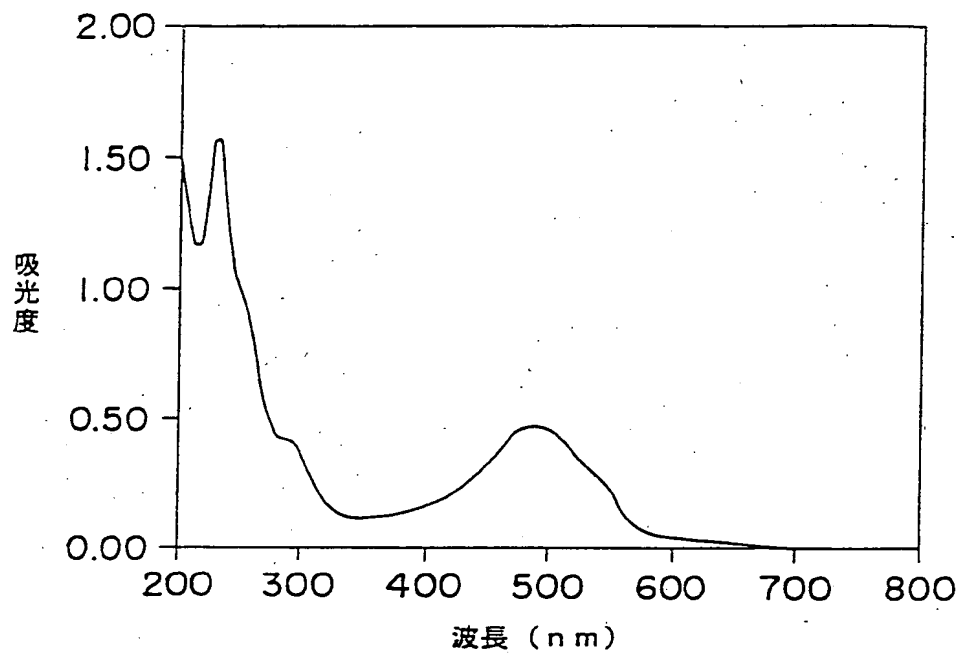


FIG. 10

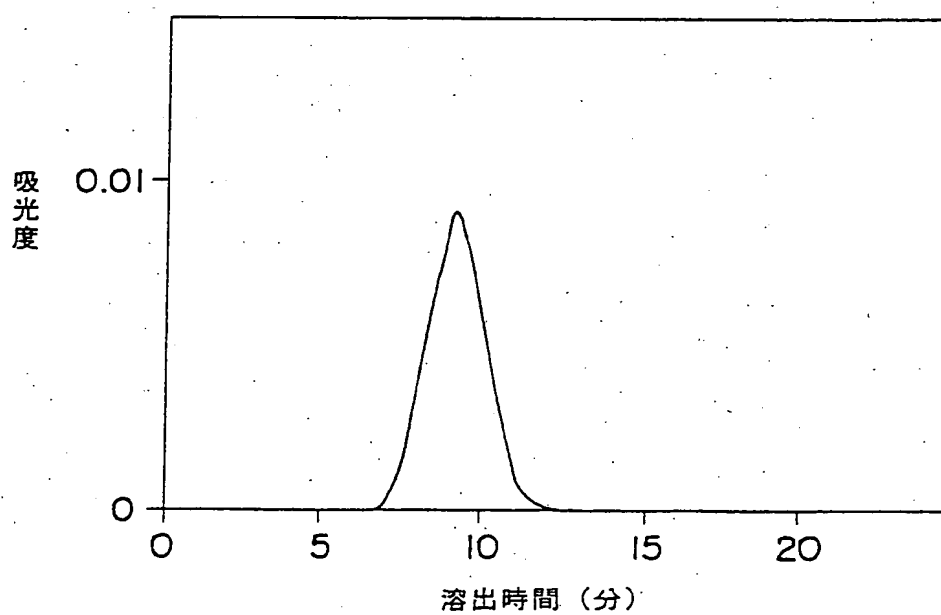


FIG. 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP92/00184

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl ⁵ C08B15/00		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
IPC	C08B11/12, 11/193, 15/00, 37/00, A61K47/36, 38	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ¹		
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
A	Carbohydrate Res. 114, p. 245-256 (1983)	1-15
A	Carbohydrate Res. 123, p. 305-314 (1983)	9-15
A	JP, A, 1-190636 (The Green Cross Corp.), July 31, 1989 (31. 07. 89), (Family: none)	1-15
A	JP, A, 1-54002 (Scandigen AB.), March 1, 1989 (01. 03. 89), & EP, A, 296740	1-15
A	JP, A, 54-14513 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), February 2, 1979 (02. 02. 79), (Family: none)	1-15
A	JP, A, 61-152634 (Zaidan Hojin Sugiyama Sangyo Kagaku Kenkyusho), July 11, 1986 (11. 07. 86), (Family: none)	1-15
<p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
April 28, 1992 (28. 04. 92)	May 19, 1992 (19. 05. 92)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
Japanese Patent Office		

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

- | | | |
|---|--|------|
| A | JP, A, 50-35316 (Dr. L. Zambelletti S.p.A.),
April 4, 1975 (04. 04. 75)
& DE, A, 2413512 | 1-15 |
| A | JP, A, 61-222927 (Ieda Research &
Development Co., Ltd.),
October 3, 1986 (03. 10. 86),
& EP, A, 190464 | 1-15 |

V. ☐ OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE ¹

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. ☐ Claim numbers because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claim numbers because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claim numbers because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

VI. ☐ OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING ²

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.
2. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:
3. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:
4. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国 際 調 査 報 告

国際出版番号PCT/JP 92 / 00184

I. 発明の属する分野の分類			
国際特許分類 (IPC) Int. Cl⁶ C 08 B 15 / 00			
II. 国際調査を行った分野			
調 査 を 行 っ た 最 小 限 資 料			
分 類 体 系	分 類 記 号		
IPC	C 08 B 11 / 12, 11 / 193, 15 / 00, 37 / 00, A 61 K 47 / 36, 38		
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの			
III. 関連する技術に関する文献			
引用文献の カテゴリー ※	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示		請求の範囲の番号
A	Carbohydrate Res. 114, p. 245-256 (1983)		1-15
A	Carbohydrate Res. 123, p. 305-314 (1983)		9-15
A	JP, A. 1-190636 (株式会社 ミドリ十字), 31. 7月. 1989 (31. 07. 89), (ファミリーなし)		1-15
A	JP, A. 1-54002 (スカンディゲン エイ. ビー.), 1. 3月. 1989 (01. 03. 89) & EP, A. 296740		1-15
A	JP, A. 54-14513 (協和豊静工業株式会社), 2. 2月. 1979 (02. 02. 79), (ファミリーなし)		1-15
※引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリーの文献			
IV. 認 証			
国際調査を完了した日		国際調査報告の発送日	
28. 04. 92		19.05.92	
国際調査機関		権限のある職員	
日本国特許庁 (ISA/JP)		4 C 7 6 2 4 特許庁審査官 種 村 慈 樹	

第2ページから続く情報

(III欄の続き)

- A JP, A. 61-152634 (財団法人 杉山産業化学研究所), 1-15
11. 7月. 1986 (11. 07. 86), (ファミリーなし)
- A JP, A. 50-35316 (ドクター エル. ザンベレッティ ソシエタ ペル アチオニ), 1-15
4. 4月. 1975 (04. 04. 75)
& DE, A. 2413512
- A JP, A. 61-222927 (イエダ リサーチ アンド 1-15

V. 一部の請求の範囲について国際調査を行わないときの意見

次の請求の範囲については特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律第8条第3項の規定によりこの国際調査報告を作成しない。その理由は、次のとおりである。

1. 請求の範囲_____は、国際調査をすることを要しない事項を内容とするものである。
2. 請求の範囲_____は、有効な国際調査をすることができる程度にまで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。
3. 請求の範囲_____は、従属請求の範囲でありかつPCT 規則6.4(a)第2文の規定に従って起草されていない。

VI. 発明の単一性の要件を満たしていないときの意見

次に述べるようにこの国際出願には二以上の発明が含まれている。

1. 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されたので、この国際調査報告は、国際出願のすべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に一部しか納付されなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付があった発明に係る次の請求の範囲について作成した。
請求の範囲_____
3. 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲に最初に記載された発明に係る次の請求の範囲について作成した。
請求の範囲_____
4. 追加して納付すべき手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加して納付すべき手数料の納付を命じなかった。

追加手数料異議の申立てに関する注意

- 追加して納付すべき手数料の納付と同時に、追加手数料異議の申立てがされた。
- 追加して納付すべき手数料の納付に際し、追加手数料異議の申立てがされなかった。

Ⅲ. 関連する技術に関する文献 (第2ページからの続き)		
引用文献の カテゴリー	引用文献名及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
	<p>デベロップメント カンパニー リミテッド), 3. 10月. 1986 (03. 10. 86) & EP, A, 190464</p>	